

**HÄMOCYANIN ALS ALLOSTERISCHES PROTEIN:
NACHWEIS VON KONFORMATIONSÄNDERUNGEN
MITTELS FLUORESZIERENDER SONDEN**

Thomas Leidescher

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

HÄMOCYANIN ALS ALLOSTERISCHES PROTEIN:
NACHWEIS VON KONFORMATIONSÄNDERUNGEN
MITTELS FLUORESZIERENDER SONDEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt von Thomas Leidescher aus Memmingen

Oktober 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hugo Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1987

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen, der durch sein großes Interesse, seine wertvollen Anregungen und durch seine stete Diskussionsbereitschaft viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ebenfalls recht herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Anette Savel, Dr. Heinz Decker, Dr. Rüdiger Paul und Dr. Walter Schartau, die mir einerseits bei der Erarbeitung vieler Methoden, andererseits durch Ihre Diskussionsbereitschaft und die Einführung in das Arbeiten mit Computern eine große Hilfe waren.

Dr. Susanne Modrow vom Max von Pettenkofer-Institut der Universität München danke ich recht herzlich für ihre Hilfe bei den Voraussagen zur Sekundärstruktur und sonstigen Eigenschaften des Hämocyanins.

Allen anderen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich sehr für die große Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Atmosphäre während meiner Promotionsarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG.....	1
MATERIAL UND METHODEN.....	7
1. Chemikalien.....	7
2. Tiere, Tierhaltung, Hämolymphegewinnung und Reinigung des Hämocyanins.....	8
3. Isolierung der Untereinheiten.....	8
4. Zweidimensionale Immunelektrophorese.....	9
5. Sauerstoffbindungskurven.....	9
6. Proteinbestimmung und UV-Spektren.....	10
7. Dialysen und Konzentrierungsmethoden.....	11
8. Elektrophoresen.....	11
a) Analytische PAGE.....	11
b) Analytische SDS-PAGE.....	11
c) Färben und Entfärben der Gele.....	12
9. Chemische Modifizierung des Hämocyanins mit Fluoreszenz- farbstoffen.....	12
10. Gasaustausch in den Fluoreszenzküvetten.....	13
11. Fluoreszenzmessungen.....	14
12. Mercaptolyse und SH-Gruppenalkylierung.....	16
13. Enzymatische Spaltungen.....	16
a) Spaltung mit Trypsin.....	16
b) Spaltung mit Staphylococcus aureus V8-Protease.....	17
14. Chromatographische Verfahren.....	17
a) Gelfiltration.....	17
b) Ionenaustauschchromatographie.....	17
c) Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	17
15. Manuelle Sequenzierung.....	18
16. Herstellung von met-Hämocyanin.....	18
ERGEBNISSE.....	19
1. Reinigung von Eurypelma californicum 37S Hämocyanin.....	19
2. Die Suche nach geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen.....	20
a) Nicht kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe.....	20
b) Kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe.....	21

c) Abtrennung von nicht gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen durch Dialyse und Gelfiltration.....	34
3. Funktionskontrolle von fluoreszenzmarkiertem Hämocyanin durch Sauerstoffbindungskurven.....	38
4. Kontrollversuche zu NBD-chlorid.....	40
a) pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von NBD-chlorid in Puffer.....	40
b) pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von NBD-chlorid nach Bindung an Rinderserumalbumin.....	42
c) Herstellung von markiertem met-Hämocyanin mit anschließenden Oxigenierungs-/Desoxigenierungsversuchen....	43
d) Bestimmung der optimalen Zeitdauer zur Äquilibration von Hämocyaninlösungen mit bestimmten Gasdrücken.....	45
5. Bestimmung der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle am Hämocyanin.....	46
6. Versuche zum Einbau der markierten Untereinheit d in ein 24-meres Hämocyaninmolekül mit den nicht markierten Untereinheiten a, bc, e, f, g.....	54
7. Fluoreszenzmessungen mit NBD-chlorid-markierten Hämocyaninlösungen.....	58
8. Proteinchemische Untersuchungen an der Untereinheit d zur Lokalisierung der NBD-chlorid Bindungsstelle.....	66
DISKUSSION.....	76
I. Zur Bindung des NBD-chlorids am Hämocyanin.....	76
1. Bewegung von Aminosäureseitenketten.....	76
2. Bewegung ganzer Proteinkettenabschnitte.....	77
3. Bewegungen von Domänen und Untereinheiten gegeneinander..	78
II. Vergleich der gewonnenen funktionellen Daten mit gängigen Modellen zur allosterischen Wechselwirkung von Proteinen....	84
ZUSAMMENFASSUNG.....	96
LITERATURVERZEICHNIS.....	99

Abkürzungen

AIC	9-Acridinisothiocyanat
ANS	1-Anilinonaphtalin-8-sulfonsäure
apo-Hc	kupferfreies Hämocyanin
BSA	Rinderserumalbumin
CM-	Carboxymethyl-
^c Hc	Konzentration an Hämocyanin
DAC	5-Dimethylaminocoumarin-4-essigsäure
DABITC	4-N,N-Dimethylaminobenzol-4'-isothiocyanat
Dansylaziridin	5-Dimethylaminonaphtalin-1-sulfonylaziridin
Dansylchlorid	5-Dimethylaminonaphtalin-1-sulfonylchlorid
Dansylglycin	N-(5-Dimethylaminonaphtalin-1-sulfonyl)glycin
DEAE-deoxi-Hc	Diethylaminoethyl-desoxygeniertes Hämocyanin
DMSDS	4,4'-Dimaleimidylstilben-2,2'-disulfonsäure
DMF	N,N-Dimethylformamid
5-DTAF	5-(4,6-Dichlortriazinylaminofluorescein
EITC	Eosin-5-isocyanat
Ethoxy	Ethoxycarbonylanthracen-9-carboxylanhydrid
F.I.	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-5-isocyanat
Gdm-HCl	Guanidiniumhydrochlorid
Hc	Hämocyanin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IAF	5-Jodacetamidofluorescein
Isatosäure	4-H-3,1-Benzoxazin-2,4-(1H)-dion
1,5-I-AEDANS	5-(Jodacetaminoethyl)aminonaphtalin-1-sulfonsäure
λ_{ex}	Anregungswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge
M	molar
μ	mikro
met-Hc	oxidiertes Hämocyanin (Cu II)
Mr	Molekulargewicht

N	Größe der allosterischen Einheit, Anzahl der wechselwirkenden aktiven Zentren
n	nano
NBD-aziridin	N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aziridin
NBD-chlorid	7-Chlor-4-nitrobenzol-2-oxa-1,3-diazol
-NH ₂	Amin-
$n_{50}^{=n_H}$	Hillkoeffizient beim Halbsättigungsdruck
n_{max}	maximaler Hillkoeffizient
O.D. 280	Optische Dichte bei 280 nm
oxi-Hc	oxigeniertes Hämocyanin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
P ₅₀	Halbsättigungsdruck in Torr bei der Sauerstoffbindung
Pyren	N-(1-Pyren)maleimid
SEP	Standard Error of Point, Standardabweichung
SDS	Natrimdodecylsulfat
s.f.	superfine
-SH	Sulphydryl-
Succinimidyl	Succinimidyl-1-pyrenbuttersäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thiolyte MQ	Monobromtrimethylammoniumbisan
TNS	2-p-Toluidinyl-naphtalin-6-sulfonsäure
TPCK	L-(1-Tosylamido-2-phenyl)-ethyl-chloromethylketon
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
Y	relative Sauerstoffbeladung (0-1, bzw. 0-100%)

EINLEITUNG

Bei Tieren, die größer als etwa 1 mm im Durchmesser sind, ist eine ausreichende Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff durch Diffusion nicht mehr gewährleistet. Deshalb haben sich Kreislaufsysteme entwickelt, in denen zur Erhöhung der Transportkapazität für Sauerstoff respiratorische Proteine zirkulieren. Im Säugerblut sind etwa 0,2 ml Sauerstoff pro 100 ml Blut physikalisch gelöst, durch die reversible Bindung an Hämoglobin erhöht sich dieser Wert um das Hundertfache (SCHMIDT-NIELSEN, 1979, S.65). Nur die Insekten wählen mit ihrem Tracheensystem, dessen feinste Verästelungen bis in die unmittelbare Nähe der Mitochondrien reichen, einen anderen Weg der Sauerstoffversorgung. An Atmungspigmenten, die so heißen, weil sie alle eine charakteristische Farbe besitzen, sind bis heute 4 verschiedene Gruppen bekannt. Im gesamten Tierreich am weitesten verbreitet und am besten untersucht ist das rote Hämoglobin, das von den Protozoen bis zu den Wirbeltieren vorkommt. Dabei kann es in Zellen (Säuger, Vögel, Fische, Polychaeten, Echinodermen, Mollusken, Insekten) oder frei im Blutplasma gelöst auftreten (Oligochaeten, Polychaeten, Mollusken, Insekten). Als sauerstoffbindendes Zentrum dient ein Porphyrinring, an dessen zentralem Eisenion der molekulare Sauerstoff reversibel angelagert wird.

Weitere eisenenthaltende Atmungspigmente sind das Hämerythrin und das Chlorocruorin. Beim ebenfalls roten Hämerythrin, das nur in Zellen vorkommt, sind jeweils zwei Eisenionen direkt an die ^{Pro-}teinkette gebunden. Hämerythrine wurden bisher bei Sipunculiden, Priapuliden, Brachiopoden und einer Polychaetengruppe nachgewiesen. Das immer im Plasma gelöste Chlorocruorin ähnelt sehr stark dem Hämoglobin anderer Invertebraten. An einem Pyrrolring des Porphyrins ist allerdings eine Vinylseitenkette durch einen Formylrest ersetzt worden. Chlorocruorin als Atmungspigment ist beschränkt auf 4 Familien der Polychaeten: Sabelliden, Serpuliden, Chlorhaemiden und Ampharetiden.



Neben den Hämoglobinen findet man im Tierreich als Atmungsprotein besonders häufig das blaue Hämocyanin. Hämocyanin enthält nicht, wie man vielleicht aufgrund des Namens vermuten könnte, eine Hämgruppe, sondern im aktiven Zentrum direkt an die Polypeptidkette gebunden zwei Kupferionen, an die sich der molekulare Sauerstoff anlagert. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung in den beiden Tierstämmen der Mollusken (Amphineuren, Cephalopoden, Gastropoden, Bivalvia) und Arthropoden (Crustaceen, Xiphosuren, Arachniden, Arachnomorphen) und ihrer hochinteressanten molekularen Eigenschaften sind die Hämocyane in den letzten Jahrzehnten in den Mittelpunkt der Forschung verschiedener Arbeitsgruppen gerückt (GHIRETTI, 1968; BANNISTER, 1977; LAMY und LAMY, 1981; WOOD, 1983; LINZEN, 1986). Alle bisher untersuchten Hämocyane haben folgende gemeinsame Eigenschaften:

- (1) Sie kommen immer frei gelöst im Blutplasma der Tiere vor,
- (2) Sie sind hochmolekulare, oligomere Proteine,
- (3) 1 Sauerstoffmolekül wird immer über 2 Kupferionen gebunden,
- (4) Hämocyane erscheinen im desoxygenierten Zustand farblos; im oxygenierten Zustand sind sie blau, verantwortlich dafür sind Maxima im nahen UV bei 340 nm sowie im Sichtbaren bei 570 nm.

Die letzten großen Zusammenfassungen über Hämocyane stammen von VAN HOLDE und MILLER (1982) sowie ELLERTON et al. (1983).

Zwischen Arthropoden- und Molluskenhämocyanin bestehen wesentliche Unterschiede. Molluskenhämocyane sind riesige Moleküle mit Sedimentationskoeffizienten bis zu 100S, entsprechend einem Molekulargewicht von bis zu 9×10^6 Dalton. Sie lassen sich unter geeigneten Bedingungen bis zu 1/20-Molekülen dissoziieren. Diese enthalten z.B. bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia* immer noch 8 Sauerstoffbindungscentren. Eine weitere Aufspaltung in die funktionellen Einheiten mit etwa 5×10^4 Dalton ist nur noch durch Peptidspaltung möglich (GIELENS et al., 1980; VAN BRUGGEN, 1983). Den funktionellen Einheiten der Molluskenhämocyane entsprechen die einzelnen Untereinheiten bei den Hämocyaninen der Arthropoden. Z.B. besteht das mit 37S sedimentierende Hämocyanin der Vogel-

spinne *Eurypelma californicum*, das ich bei meinen Versuchen verwendet habe, aus 4x6 Untereinheiten, die im alkalischen Milieu dissoziieren.

Untersucht man diese Untereinheiten elektrophoretisch oder mit immunologischen Methoden, so zeigt sich, daß sie nicht einheitlich sind. Insgesamt finden sich 7 verschiedene Untereinheiten, die mit a bis g bezeichnet werden. Dabei treten a, d, e, f und g als Monomere auf, die Untereinheiten b und c sind zu einem Heterodimer vereinigt; auch die Untereinheit f findet sich zu einem gewissen Teil als Homodimer (MARKL et al., 1980). Bei der Untersuchung weiterer Arthropodenhäemocyanine zeigte es sich, daß diese Heterogenität der Untereinheiten ein allgemeines Bauprinzip ist (Review siehe LINZEN, 1983).

MARKL et al. (1980, 1981) konnten für das Häemocyanin von *Eurypelma californicum* zeigen, daß die Untereinheiten in einem konstanten Verhältnis vorliegen ($a:b:c:d:e:f:g = 4:2:2:4:4:4:4$). Jede Unter-



Abb. 1: Modell der Quartärstruktur des 37S Häemocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* (nach MARKL et al., 1981).

einheit im nativen Molekül hat eine spezifische Position, wie mit Hilfe antikörpermarkierter Untereinheiten im Elektronenmikroskop nachgewiesen wurde (MARKL et al., 1981). Das daraus abgeleitete Modell zeigt Abbildung 1.

Die Zusammenlagerung von 24 Untereinheiten zu einem funktionellen Gesamtmolekül führt zu neuen Eigenschaften, die den isolierten Untereinheiten fehlen. Schon LOEWE (1978) beschreibt die enorm hohe Kooperativität ($n_{50} = 7$) von Eurypelma-Hämocyanin im Bereich um pH 8. Der Bohreffekt ist hierbei stark ausgeprägt (-1,2). SABEL (1984) untersuchte die Kooperativität nicht nur am nativen Gesamtmolekül, sondern auch an Dissoziationszwischenstufen. Dabei fand sie heraus, daß nur im 24-meren Hämocyanin die Kooperativität voll ausgebildet ist, schon das Entfernen von 5 Untereinheiten halbiert den Wert des Hillkoeffizienten. 12 Untereinheiten sind genauso kooperativ wie 19, und dissoziiert man weiter zum Hepta- und Hexamer, so fällt der Hillkoeffizient auf 20% des Ausgangswertes. Dabei bleiben p_{50} -Wert und der Bohreffekt für das Gesamtmolekül und alle Zwischenstufen nahezu unverändert. Die Kooperativität dagegen nimmt sprunghaft ab und die Hexamere besitzen eine sehr geringe "Grundkooperativität".

Schließlich befaßte sich DECKER (1981) sehr eingehend mit kooperativen Wechselwirkungen am Hämocyanin. Er versuchte, seine Daten in das Two-State-Modell nach MONOD, WYMAN und CHANGEUX (1965, sog. MWC-Modell) einzupassen. Hierbei wird bei kooperativen Proteinen von zwei Zustandsformen ausgegangen (R=relaxed mit hoher Affinität zum Substrat und T=tense mit niedriger Substrataffinität). Alle Protomere müssen entweder in der R- oder T-Form vorliegen, hybride Zwischenzustände sind nach diesem Modell nicht erlaubt. DECKER et al. (1983) zeigten jedoch, daß das einfache MWC-Modell auf das Hämocyanin von Eurypelma californicum nicht anwendbar ist. Ebenso wurde die Nichtanwendbarkeit dieses Modells für Crustaceenhämocyanine demonstriert (RICHEY et al., 1985). RICHEY et al. forderten einen zusätzlichen Konformationszustand, der nicht einem funktionellen Hybridzustand entspricht. Geleitet von der offensichtlichen strukturellen Hierarchie entwickelten

DECKER et al. (1986) ein erweitertes MWC-Modell, welches Hierarchien allosterischer Wechselwirkungen zugrundelegt. Die ursprüngliche Idee dieses sog. Nesting-Modells geht auf WYMAN (1972, 1986) zurück. Eine der Konsequenzen dieses Modells ist die Forderung von wenigstens vier verschiedenen Konformationszuständen im Eurypelma-Hämocyanin. Das Nesting-Modell kann auf einfache Weise die Ergebnisse von funktionellen Untersuchungen an verschiedenen respiratorischen Pigmenten erklären (GILL et al., 1986; ROBERT et al., 1987).

Die Aufgabe dieser Arbeit ist es, Konformationsänderungen des Hämocyanins während der Sauerstoffbeladung mit Hilfe extrinsischer Fluoreszenzfarbstoffe zu untersuchen. Dabei ist natürlich von besonderem Interesse, ob sich mehr als zwei Konformationszustände mittels dieser Methode nachweisen lassen.

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine wertvolle Methode bei der Untersuchung von biologischen Systemen. Die Anregungs- und Emissionsspektren von intrinsischen und extrinsischen Chromophoren geben Auskunft über die Proteinkonformation, Ligandenbindung und Zugänglichkeit des Chromophors für Quenchersubstanzen. Durch Fluoreszenzpolarisationsmessungen sind Aussagen über die Brown'sche Molekularbewegung und die Orientierung von Fluoreszenzfarbstoffen in makromolekularen Systemen möglich. Der Energietransfer zwischen zwei im Makromolekül enthaltenen, bzw. daran gebundenen Chromophoren ist zur Distanzmessung auf molekularer Ebene verwendet worden (STRYER 1968; 1978).

Fluoreszenzmessungen (Übersichtsartikel darüber z.B. bei STRYER, 1968, KANAOKA, 1977, BREWER et al., 1977, S.203-246 sowie CANTOR und TIMASHEFF, 1982) sind bei einer großen Zahl von Proteinen durchgeführt worden. LEHRER und LEAVIS (1984) verwendeten Änderungen der intrinsischen Tyrosinfluoreszenz, um Konformationsänderungen am Troponin C durch die Bindung von Protonen nachzuweisen. Threoninbindung an Aspartatkinase I, die eine starke Hemmung des Enzyms verursacht, untersuchten BROGLIE und TAKAHASHI (1983) mit Hilfe eines fluoreszierenden Substratanalogs. BLEWITT et al. (1984) konnten über die intrinsische Tryptophanfluoreszenz nach-

weisen, daß Konformationsänderungen am Diphtherietoxin ohne Natrium zwischen pH 4 und 4,5, mit 150 mM Natrium im Ansatz aber erst zwischen pH 5 und 5,5 auftraten. JULLIEN und GAREL (1981) schließlich konnten durch gezieltes Plazieren einer Fluoreszenzsonde im aktiven Zentrum von Ribonuclease A einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung des Faltungsmechanismus dieses Proteins liefern.

RICCHELLI und SALVATO (1979) haben am *Octopus vulgaris*-Hämocyanin die bisher eingehendsten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen an diesem Protein durchgeführt. Sie verwendeten dabei die nicht kovalent bindende Fluoreszenzsonde 1-Anilino-8-naphthalinsulfonsäure (ANS). Im nativen Hämocyanin band das ANS nicht an das Protein, erst im kupferfreien apo-Hämocyanin lagerte sich der Farbstoff an der Kupferbindungsstelle an. Funktionelle Aussagen waren mit diesem kupferfreien Hämocyanin aber nicht möglich. Sie bestimmten die Dissoziationskonstante des ANS-Hämocyanin-Komplexes (10^{-4} M) und stellten fest, daß die Menge des gebundenen ANS vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Harnstoffkonzentration der Lösung abhängt.

Neben den eben nur exemplarisch erwähnten Veröffentlichungen gibt es noch eine Vielzahl weiterer Beispiele für erfolgreich eingesetzte Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung von Konformationsänderungen in Proteinen. Diese Ergebnisse gaben zu der Hoffnung Anlaß, Fluoreszenzsonden auch erfolgreich zur Bestimmung von Konformationsänderungen am Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* einsetzen zu können.

Für meine Arbeit ergaben sich damit folgende Punkte, die im wesentlichen zu untersuchen waren:

- (1)a) Die Suche nach einer geeigneten Fluoreszenzsonde,
b) Die Suche nach optimalen Markierungsbedingungen,
- (2) Die Prüfung, ob das Hämocyanin durch die Markierungsreaktion funktionell intakt bleibt,
- (3) Die Untersuchung von Konformationsänderungen während Oxygenierungs-/bzw. Desoxygenierungsvorgängen,
- (4) Die Bestimmung des Bindungsortes der Fluoreszenzsonde am Hämocyanin.

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Sämtliche Reagenzien waren von p.A. Qualität. Wenn möglich, wurden Chemikalien höherer Reinheit verwendet (z.B. "spectroscopic grade"). Sie wurden von MERCK, Darmstadt, bezogen mit Ausnahme von:

Biogel A 5m	BIORAD, Richmond, CA, USA
Thiolyte MQ	CALBIOCHEM, Frankfurt/Main
Vydac RP 18	CHROMPACK, Middelburg, Holland
DABITC	FLUKA, Neu-Ulm
Stickstoff (nachgereinigt)	LINDE, München
Lampenargon	
Sauerstoff (100%)	
Eichgas (5% Sauerstoff)	
Ultrogel Aca 44	LKB-Produkte, Bromma, Schweden
Agarose M	
Staphylococcus aureus-V8-Protease	MILES, Elkart, IN, USA
Trypsin (TPCK-behandelt)	MILLIPORE CORPORATION, Eschborn
AIC	MOLECULAR PROBES, Eugene, OR, USA
ANS	
bis-ANS	
DAC	
Dansylaziridin	
Dansylchlorid	
Dansylglycin	
DMSDS	
5-DTAF	
ETC	
Ethoxy	
FITC	
1,5-I-AEDANS	
IAF	
Isatosäure	
NBD-aziridin	
NBD-chlorid	
Pyren	
Succinimidyl	
TNS	

Sephadex G 25 s.f.	PHARMACIA, Uppsala, Schweden
CM-Sepharose Cl 6B	
DEAE-Sepharose Cl 6B	
Sephacryl S 300 s.f.	
Polyamidfolien	SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel
Coomassie Brilliant Blue	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	
TEMED	
PEG	
Visking-Dialysesschläuche	
Guanidiniumhydrochlorid	SIGMA, Deisenhofen
Imidazol	
SDS	
Filterpapier Whatman Nr.1	WHATMAN, Maidstone, England

2. Tiere, Tierhaltung, Hämolymphegewinnung und Reinigung des Hämocyanins

Vogelspinnen der Art *Eurypelma californicum*, die im Südwesten der USA weit verbreitet vorkommt, wurden von CAROLINA BIOLOGICAL SUPPLY COMPANY, Burlington, NC, USA, bezogen. Die Bedingungen, unter denen die Tiere gehalten wurden, finden sich bei SCHNEIDER et al. (1977). Die Gewinnung der Hämolymphe wurde bei LOEWE und LINZEN (1973) beschrieben. Die Tiere wurden ungeachtet ihres Geschlechts verwendet. Es wurde jeweils die Hämolymphe von 6-8 Tieren vereinigt und nach Abtrennen der zellulären Bestandteile (Eppendorfzentrifuge, 12000 rpm, bei 4⁰ C für 4 min) auf eine mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,80 äquilibrierte Biogel A 5m-Säule (1,8 x 200 cm) aufgetragen. Durch diese Celfiltration wurde das Hämocyanin von einem weiteren Protein (Lipoprotein) abgetrennt.

3. Isolierung der Untereinheiten

Die alkalische Dissoziation des Hämocyanins in Monomere (a,d,e,f,g) und Dimere (bc,ff) und deren Auftrennung durch Gelfiltration wurde nach den Angaben von SCHNEIDER et al. (1977) durchgeführt. Die Ergebnisse der Trennungen wurden mit Hilfe der

zweidimensionalen Immunelektrophorese untersucht.

4. Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die zweidimensionale Immunelektrophorese nach Laurell wurde mit den Modifikationen von WEEKE (1973) durchgeführt. Um Material zu sparen, wurden alle Elektrophoresen auf nur 4x5 cm großen Platten durchgeführt (sog. "Minis"). Damit verringerte sich der Agarose- und Antiserumverbrauch auf ein Viertel der üblichen Menge (KEMPTER, 1983). Die Elektrophoresekammer war von der Firma LKB (2117 Multiphor). Die Gewinnung des Antiserums besorgte dankenswerter Weise Frau Dr. Savel. In ihrer Dissertation (1984) ist die Kaninchenimmunisierung und Antiserumgewinnung genau beschrieben.

5. Sauerstoffbindungskurven

Kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven wurden nach den Methoden von LOEWE und LINZEN (1975, photometrisch) sowie LOEWE (1978, fluorometrisch) gemessen. Bei der photometrischen Methode macht man sich das Verschwinden des Absorptionsmaximums bei 338 nm im desoxygenierten Zustand zunutze. Ein wesentlicher Nachteil gegenüber der fluorometrischen Methode ist die 10 bis 20-fach höhere Proteinkonzentration (1,8-2,0 mg/ml), die im photometrischen Verfahren verwendet wird. Die Auswertung der Kurven erfolgt jedoch für beide Methoden auf dieselbe Weise.

Bei der fluorometrischen Methode wurde mit einem Ratio Filterfluorimeter der Firma Farrand die Hämocyaninfluoreszenz bei 350 nm gemessen. Die tryptophanspezifische Fluoreszenz bei dieser Wellenlänge wird im oxigenierten Zustand nahezu vollständig gelöscht. Die Sauerstoffelektroden wurden von der Firma Bachofer (Reutlingen) geliefert. Sie wurden vor Gebrauch mit sehr feinem Schmirgelpapier (Körnung 360) abgeschliffen, kurz in konzentrierte Salpetersäure getaucht, sehr gut mit destilliertem Wasser abgespült und in 3 M KCl chloriert (Gegenspannung durch 1,5 V Batterie). Dann wurde ein 6 µm dickes Teflonfolienstück auf 2x2 cm zurechtge-

schnitten, ein Tropfen 1 M KCl auf die Mitte aufgebracht, die chlorierte Elektrode in den Tropfen eingetaucht, die Teflonmembran an den Seiten hochgezogen und mit einem Gummiring befestigt. Die Membran lag jetzt faltenfrei auf der Elektrodenspitze auf. Größere überstehende Teflonstücke wurden abgeschnitten, die restlichen kleineren wurden mit Isolierband am Schaft der Elektrode befestigt. Die Elektrode sprach bei O_2 - bzw. N_2 -Begasung jeweils an (Kontrolle über Schreiber, der 90%-Wert eines Gases wurde nach etwa 20 Sekunden erreicht). Das Probenvolumen betrug 500 μ l, die Proteinkonzentration lag bei 0,1 mg/ml. Die Temperatur des Küvettenhalters und der zugeleiteten Gase wurde mit Hilfe eines Wasserbades bei konstanten 20°C ($\pm 0,1^\circ$ C) gehalten. Zur Auswertung wurden die Originalsauerstoffbindungskurven auf einem Digitalisiertablett (Summagraphics) befestigt. Mit einem Stift wurden dann 25-30 Punkte auf dieser Kurve abgegriffen. Das Digitalisiertablett war mit einem Tektronix TK 31 Tischrechner verbunden. Das Programm zur Umwandlung der abgegriffenen Daten in Punkte des Hill-Plots wurde von DECKER (1981) ausgearbeitet. Beim Hill-Plot trägt man den Logarithmus des Sauerstoffpartialdruckes gegen $\log Y/1-Y$ auf (Y = Grad der Sauerstoffsättigung). Der Schnittpunkt dieser Kurve mit der x-Achse ergibt den p_{50} -Wert (als Maß für die Sauerstoffaffinität des Hämocyanins), die Steigung einer Tangente an diesem Punkt entspricht dem n_{50} -Wert. Der n_{max} -Wert ergibt sich aus der größten Steigung einer angelegten Tangente an der gesamten Kurve.

6. Proteinbestimmung und UV-Spektren

Die Hämocyaninkonzentration wurde routinemäßig durch Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktionseinheit etwa 1 mg/ml (LOEWE und LINZEN, 1973).

Wurde die genaue Proteinkonzentration bei markiertem Hämocyanin benötigt, konnte die photometrische Proteinbestimmung nicht angewandt werden, da z.B. NBD-chlorid bei 280 nm signifikant absorbiert. Deshalb wurde markiertes Hämocyanin nach LOWRY et

a1. (1951) bestimmt. Hierbei diente Rinderserumalbumin als Proteinstandard. UV-Spektren des Hämocyanins im Bereich von 250-400 nm wurden mit einem Varian Photometer Cary 118 aufgenommen.

7. Dialysen und Konzentrierungsmethoden

Abtrennung niedermolekularer Bestandteile, Pufferwechsel und die Konzentrierung von Proteinlösungen wurde in Visking Dialyseschläuchen mit einer Ausschußgrenze von 10000 Dalton durchgeführt. Zur Konzentrierung wurde das Protein gegen eine 25% (w/w) Polyethylenglycollösung im jeweiligen Puffer dialysiert. Isolierte Untereinheiten konnten zur Konzentrierung auch an den Anionenaustauscher DEAE Sepharose Cl 6B in Glycin/NaOH Puffer pH 9,6 gebunden und anschließend mit einer 1 M NaCl-Lösung wieder abgelöst werden. Die Entfernung des Salzes erfolgte wiederum durch Dialyse.

8. Elektrophoresen

a) Analytische PAGE

Elektrophoresen wurden bei etwa 4°C im Gelsystem Nr.6 von Maurer (1968) und im alkalischen Bereich bei pH 8,8 nach LAEMMLI (1970) mit einem linearen Acrylamidgradienten von 5-10% durchgeführt. Die Anfangsspannung betrug 80 V; nachdem die Proben aus den Auftrags-taschen in das Sammelgel (3% Acrylamid, pH 6,8) eingewandert waren, wurde die Spannung auf 250 V erhöht. Die Gesamtlaufzeit betrug zwischen 3 und 4 Stunden. Vor dem Auftragen (etwa 2 µg Protein pro zu erwartender Bande erwiesen sich als ausreichend) wurden die Proben mit Bromphenolblau und Saccharose versetzt.

b) Analytische SDS-PAGE

Es wurde nach LAEMMLI (1970) wie unter a) angegeben verfahren. Trenn- und Sammelgel enthielten 0,1%, der Elektrodenpuffer 0,2% SDS. Im Trenngel wurde ein kontinuierlicher Gradient von 10-20% Acrylamid gewählt. Bei der SDS-PAGE wurden die aufzutragenden Proben vorher nach WEBER und OSBORN (1969) mit β-Mercaptoethanol

und SDS denaturiert.

c) Färben und Entfärben der Gele

Proteinbanden in Gelen ohne SDS wurden mit dem sog. "Progressiv-Färber" gefärbt: 1,25 g Coomassie Brilliant Blue G 250 + 46 ml Eisessig + 454 ml Methanol als Stammlösung, davon 30 ml mit 250 g TCA versetzen und auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen. Färber für SDS-Gele sind bei WEBER und OSBORN (1969) angegeben (ebenfalls auf Coomassie Brilliant Blue Basis). 2 Stunden reichten für das Anfärben aus. Zum Entfärben wurden die Gele über Nacht in ein Wasser-Eisessig-Methanol-Gemisch (175:15:10) gelegt. Anschließend wurden die Gele auf Ilford HP5-Film mit einem Gelbfilter fotografiert.

9. Chemische Modifizierung des Hämocyanins mit Fluoreszenzfarbstoffen

Alle Markierungsvorgänge wurden in 0,025 M Natriumboratpuffer vorgenommen. Der pH-Wert hing jeweils von der zu modifizierenden Gruppe ab. Für das Markieren von Sulfhydrylgruppen eignet sich ein pH zwischen 7,0 und 8,0 (pK-Wert der Seitengruppe des Cysteins 8,3; siehe LEHNINGER, 1977, S. 64). Oberhalb pH 8 dominieren die Reaktionen mit Tyrosin (pK 10,1) und Lysin (pK 10,5), bei geringeren pH-Werten liegen die Thiolgruppen protoniert vor und sind somit wenig reaktiv. Die selektive Modifikation von ϵ -Aminogruppen in Lysinresten von Proteinen ist einfach, wenn der pH-Wert über 8,8 angehoben wird. Ab diesem Wert liegen die Aminogruppen zum größten Teil unprotoniert vor. Dies aber ist die Voraussetzung, damit die Reaktion mit meßbarer Geschwindigkeit ablaufen kann. Optimale Bedingungen können meist nur empirisch bestimmt werden. Gute Hinweise für diese Bedingungen finden sich bei HAUGLAND (1983).

Für das Markieren von Hämocyanin mit NBD-chlorid mußte vor allem darauf geachtet werden, daß bis zur völligen Abtrennung des ungebundenen Farbstoffes alle Vorgänge im Dunkeln abliefen. Um die ϵ -Aminogruppen von Lysin selektiv umsetzen zu können, wurden die

Reaktionen in 0,025 M Natriumboratpuffer pH 8,8 durchgeführt. Ein höherer pH konnte nicht verwendet werden, weil das Hämocyanin ab pH 9,0 in seine Untereinheiten zu dissoziieren beginnt. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 4 und 5 mg/ml. NBD-chlorid wurde in einer kleinen, lichtgeschützten Flasche mit Dimethylformamid (DMF), das sich als das beste Lösungsmittel erwies, versetzt. Die Endkonzentration an DMF im Ansatz blieb immer unter 1%. Die NBD-chloridlösungen wurden jede Woche frisch angesetzt. Die Markierungsreaktion dauerte 2 Stunden bei 25⁰C im Wasserbad. Dazu wurde das verwendete Reagenzglas mit Aluminiumfolie lichtdicht umwickelt. Die Reaktionen mit sulfhydrylspezifischen Reagentien wurden in 0,025 M Natriumboratpuffer pH 7,50 durchgeführt.

Zur Abtrennung der ungebundenen Reagentien stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Dialyse und Gelfiltration. Nicht an Hämocyanin gebundene Reagentien wurden über eine 30 cm lange, 0,8 cm im Durchmesser betragende Sephadex G 25 s.f. Gelfiltrations-säule abgetrennt. Die Säule wurde ebenfalls mit Aluminiumfolie lichtdicht umwickelt. Dabei konnte die Lösung durch die Wahl eines geeigneten Puffers gleich umgepuffert werden. Für die Fluoreszenzmessungen und Sauerstoffbindungskurven wurde dazu meist 0,1 M Tris/HCl-Puffer verwendet.

Dialysen wurden über Nacht mit zweimaligem Pufferwechsel gegen den gewünschten Puffer durchgeführt.

10. Gasaustausch in den Fluoreszenzküvetten

Die verschiedenen Sauerstoffpartialdrucke in der Fluoreszenzküvette wurden tonometrisch hergestellt. Die Begasung der Küvette wurde durch einen verschließbaren Stutzen vorgenommen. Durch den Stutzen wurde ein Kapillarschlauch bis kurz über die Flüssigkeitsoberfläche in der Küvette eingeführt. Nach etwa 5 Minuten Gaseinleitung wurde der Schlauch vorsichtig herausgezogen, der Stutzen sofort abdichtet und die Küvette leicht für 50-60 Sekunden

geschüttelt (zu starkes Schütteln kann zur Denaturierung des Proteins führen). Dann wurde wieder für 5 Minuten begast, dann geschüttelt u.s.w. für insgesamt 60 Minuten. Dies reicht zum völligen Gasaustausch aus, wie ich durch UV-Spektren nach jedem Schütteln zwischen 300 und 400 nm nachweisen konnte. Das Maximum bei 338 nm hat nach einer Stunde einen konstanten Wert erreicht. Die entsprechenden Gasgemische wurden mit einer Wösthoffpumpe hergestellt. Dabei ist eine Einstellung in 1%-Schritten möglich. Als sauerstofffreies Gas wurde Lampenargon (92% Argon, 8% Stickstoff) verwendet. Da dieses Gemisch (bzw. Argon) schwerer als Luft ist bleibt es auf der Flüssigkeitsoberfläche liegen und verringert somit die Gefahr einer Reoxidation durch Luftsauerstoff beim Herausziehen des Schlauches vor dem Schütteln. Um ein Eindicken der Proteinlösung durch trockenes Gas zu vermeiden, wurde das fertige Gasgemisch durch zwei Gasbefeuchtungskammern geschickt.

11. Fluoreszenzmessungen

Zu den Fluoreszenzmessungen wurde ein Spex Fluorolog 211 mit einer 450 Watt Xenonlampe verwendet. Der Küvettenhalter wurde über ein Wasserbad mit $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ temperiert. Die tatsächlichen Spaltbreiten (S_1, S_2, S_3, S_4 , siehe Abb. 2) von 0,5 mm und 1,25 mm entsprachen einem Bandpass von 0,9 nm bzw. 2,25 nm auf dem Gitter (1200 Linien/mm). Die Schrittbreite betrug jeweils 0,2 nm, die Integrationszeit lag bei 10 Sekunden. Anregungsspektren bei Fluoreszenzmessungen sollten dem Absorptionsspektrum der Verbindung entsprechen. Vergleicht man von einer Substanz die beiden Spektren, so stellt man oft erhebliche Unterschiede fest. Die Ursache hierfür sind gerätebedingte, wellenlangenabhängige Charakteristiken, die sich den Spektren überlagern. Auch die Intensität der 450-Watt Xenonlampe zeigt eine starke spektrale Abhängigkeit. Eine Verbindung wird (bei gleicher angenommener Absorptionsintensität) bei kürzeren Wellenlängen weniger zur Fluoreszenz angeregt als bei längeren. Dieser Effekt wirkt sich, zusammen mit der wellenlangen-

abhängigen Charakteristik des Gitters im Anregungsmonochromator (das bei 250 nm "geblazt" ist) auf das Anregungsspektrum aus, während das optische System des Emissionsmonochromators sowie der Photomultiplier das Fluoreszenzemissionsspektrum beeinflussen. Um die wahren Spekten zu erhalten muß man deshalb eine Korrektur durchführen.

Zur Korrektur verwendet man im Spex Fluorolog einen Quantenzähler (Rhodamin B; 40 mg abwiegen, in 5 ml Ethylenglycol für 24 Stunden unter N_2 -Atmosphäre lösen, dann in Fluoreszenzküvette überführen, nochmals mit Stickstoff überschichten und luftdicht abschließen; nach TAYLOR und DEMAS, 1979). Rhodamin B hat zwischen 210 und 530 nm eine nahezu konstante Absorption. Über einen halbdurchlässigen Spiegel werden etwa 5% des aus dem Anregungsmonochromator austretenden Lichts in die mit Rhodamin B-Lösung gefüllte Küvette ausgeblendet. Bei der angegebenen Konzentration wird praktisch das ganze einfallende Licht absorbiert. Die Fluoreszenz des Farbstoffs wird über einen eigenen Photomultiplier (P2) gemessen und ist unabhängig von der Wellenlänge proportional der Intensität des

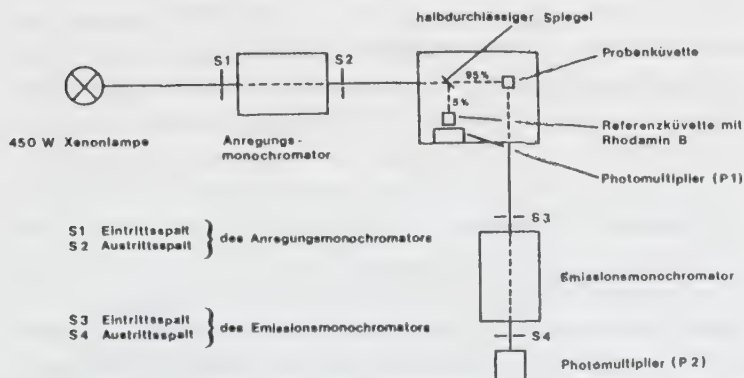


Abb. 2: Aufbau des Spex Fluorolog 211

einfallenden Lichts. Es teilen sich so die wellenlängenabhängigen Schwankungen des Anregungslichts dem Probenphotomultiplier (P1) mit. Elektronisch wird das Verhältnis aus dem Signal von Proben- und Korrekturphotomultiplier gebildet (P1/P2), so daß ein korrigiertes Fluoreszenzspektrum entsteht (Abb. 2).

Die Kurven wurden dann mit einem HI-Plot von Bausch und Lomb ausgedruckt.

12. Mercaptolyse und SH-Gruppen-Alkylierung

Die Mercaptolyse wurde wie bei CRESTFIELD et al. (1963) beschrieben durchgeführt. Nach limitierter nativer Trypsinolyse der markierten Untereinheit d wurde das Lyophilisat in 2 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 8,2, 6 M an Guanidiniumhydrochlorid gelöst. Um die Disulfidbrücken zu reduzieren (Mercaptolyse) wurden pro mg Protein 1 μ l Mercaptoethanol zugegeben (in einem 10 ml Spitzkolben). Jetzt wurde unter ständigem Stickstoffstrom zunächst für 20 Minuten bei 56°C, dann für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Carboxymethylierung der Sulfhydrylgruppen erfolgte im Dunkeln unter ständigem Stickstoffstrom. Dazu wurden pro mg Protein 2,25 mg Jodessigsäure zugegeben, die in 1 N NaOH gelöst worden war (10 μ l 1 N NaOH pro 2,25 mg ICH_2COOH). Die Lösung konnte für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur reagieren. Danach wurde die Lösung im Dunkeln gegen 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 4,50, 8 M an Harnstoff dialysiert.

13. Enzymatische Spaltungen

a) Spaltung mit Trypsin

Für die limitierte Spaltung der markierten Untereinheit d wurde das Protein über Nacht gegen 0,1 M $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 8,0 dialysiert. Zu dieser Lösung wurde 2% (w/w) TPCK-behandeltes Trypsin im selben Puffer zugegeben. Im Wasserbad wurde nun für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und danach durch die Zugabe von 10 μ l Eisessig die

Reaktion gestoppt. Anschließend wurde die Lösung lyophilisiert.

b) Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8-Protease

Nach der Isolierung des markierten Trypsinspaltstückes dT_n 37 wurde dieses gegen 0,1 M $(NH_4)HCO_3$ + 2mM EDTA, pH 7,8 dialysiert und für 24 Stunden mit 2% (w/w) *Staphylococcus aureus* V8-Protease in H_2O versetzt. Die Reaktion wurde durch Ansäuern mit Eisessig auf pH 4,0 abgestoppt. Die Lösung wurde dann lyophilisiert.

14. Chromatographische Verfahren

a) Gelfiltration

Zur Abtrennung von ungespaltenem Material und zur Entfernung von Guanidiniumhydrochlorid wurde das Spaltgemisch nach der nativen Trypsinspaltung über Sephacryl S 300 s.f. aufgetrennt. Die Säule (1,5 x 150 cm) wurde vorher mit 0,05 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 8 M an Harnstoff äquilibriert. Die Durchflußrate betrug 10 ml/h.

b) Ionenaustauschchromatographie

Zur Auftrennung der beiden Bruchstücke dT_n 34 und dT_n 37 wurde eine Ionenaustauschchromatographie über CM-Sepharose Cl 6B (Kationenaustauscher) durchgeführt. Die Säule war 15 cm lang bei einem Durchmesser von 1 cm. Das Protein wurde in 0,05 M Natriumacetat + 8 M Harnstoff pH 4,5 aufgetragen und anschließend ein linearer Gradient von 0 - 0,3 M KCl (60 ml + 60 ml) im selben Puffer angelegt. Die Durchflußrate betrug 2 ml/h und es wurden 30-Minuten-Fractionen gesammelt.

c) Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Peptide aus der *Staphylococcus aureus* V8-Protease-Spaltung wurden über eine C_{18} -reversed-phase-Säule (Vydac, 0,46 x 25 cm), die an ein HPLC-Gerät der Firma LKB angeschlossen war, getrennt. Zur Elution wurde das sog. "TFA-System" benutzt. Lösungsmittel A war 0,1%ige (v/v) Trifluoressigsäure in bidestilliertem Wasser, Lösungsmittel B entsprach 80% Acetonitril in A.

Es wurde ein linearer Gradient über 50 Minuten von 100% A bis 70% B in A angelegt. Die Trennung erfolgte bei Raumtemperatur. Die Peptide wurden im Durchflußphotometer bei 210 nm detektiert und

manuell fraktioniert. Sie wurden auf NBD-chlorid spezifische Fluoreszenz untersucht und anschließend lyophilisiert.

15. Manuelle Sequenzierung

Die manuelle Sequenzierung der NBD-chlorid-positiven Peptide wurde nach der Methode von CHANG et al. (1978) mit dem DABITC-Reagenz durchgeführt. Folgende Modifikationen wurden vorgenommen:

- Alle Inkubationen wurden bei 56⁰ C durchgeführt
- Zur Konvertierung der Thiazolinone in die Thiohydantoine wurde 50% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet.

Die 4-N,N-Dimethylaminobenzol-4'-thiohydantoin-Derivate (DABTH) der Aminosäuren wurden auf 2,5 x 2,5 cm großen Polyamidfolien identifiziert. Da die Ausgangspeptide für die Spaltung reduziert und carboxymethyliert worden waren, wurde auf den Chromatogrammen an Stelle von DABTH-Cystein DABTH-Carboxymethyl-Cystein nachgewiesen.

16. Herstellung von met-Hämocyanin

Dazu wurde NBD-chlorid markiertes Hämocyanin desoxygeniert und für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit H₂O₂ versetzt. Das molare Verhältnis Cu:H₂O₂ betrug 1:2500 (FELSENFELD und PRINTZ, 1959). Überschüssiges H₂O₂ wurde anschließend weg dialysiert. UV-Absorptionsspektren zeigten dann nach Reoxidation durch Verschwinden der Absorptionsbande bei 340 nm an, daß das Hämocyanin nicht mehr in der Lage war, Sauerstoff zu binden.

ERGEBNISSE

1. Reinigung von *Eurypelma californicum* 37S Hämocyanin

Um immer möglichst frisches Hämocyanin für funktionelle Untersuchungen zur Verfügung zu haben wurde etwa alle 4 Wochen die frisch gesammelte Hämolymphe von 3-4 Tieren über eine Biogel A5m-Säule aufgetrennt. In Abbildung 3 ist das Elutionsprofil einer solchen Auftrennung wiedergegeben. In den konzentriertesten Fraktionen befanden sich bis zu 5 mg/ml 37S Hämocyanin. Nach entsprechender Verdünnung wurden zur Kontrolle Sauerstoffbindungskurven des gewonnenen Materials in 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,8 durchgeführt. Die maximalen Hillkoeffizienten lagen meist bei 6, der höchste Wert betrug 7,2. Nur eine Aufarbeitung hatte einen $n_{\max}$ unter 5,5; sie wurde nicht für funktionelle Untersuchungen herangezogen.

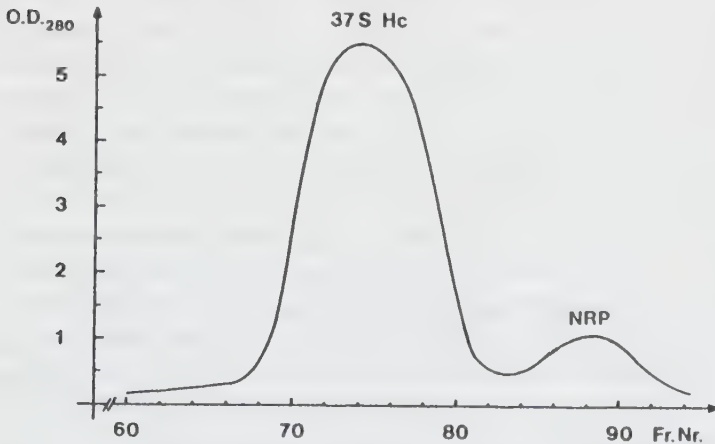


Abb. 3: Auftrennung der Hämolympheproteine über eine Biogel A5m-Säule. Durchflußrate 4 ml/h, 60 min Fraktionen; Elutionspuffer 0,1 M Tris/HCl, pH 7,8; NRP = nicht respiratorisches Protein.

2. Die Suche nach geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen

Meine erste Aufgabe bestand darin, eine geeignete Fluoreszenzsonde zu finden, die nach Bindung an das Hämocyanin Unterschiede im Emissionsverhalten in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung zeigen würde. Im wesentlichen unterscheidet man zwischen zwei Möglichkeiten der Markierung. Auf der einen Seite kann ein Farbstoff über hydrophobe Wechselwirkungen mit einem Protein interagieren, andererseits ist auch eine kovalente Bindung an reaktive Seitengruppen der Aminosäureketten möglich. Beispiele für Untersuchungen mit ANS, TNS und bis-ANS, fluoreszierenden Stoffen die nicht kovalent binden, findet man bei z.B. bei RICCHELLI und SALVATO (1979), ARAV et al. (1983), STRICKLAND et al. (1984) und MUSCI und BERLINER (1985). FRIEDEN et al. (1980) verwendeten 1,5-I-AEDANS und HIRATSUKA und UCHIDA (1980) N-Methyl-2-anilino-6-naphthalinsulfonylchlorid um Konformationsänderungen an Proteinen mit kovalenten Fluoreszenzfarbstoffen nachzuweisen. YASUOKA-YABE und KAWAKITA (1983) gelang dieses mit N-(1-anilinonaphtyl)-4-maleinimid und LEE und FORTES (1984) waren mit dem neu synthetisierten Farbstoff Lucifer Yellow CH erfolgreich. Genaue Vorschriften zum Markieren verschiedener Proteine finden sich in vielen Veröffentlichungen, für Hämocyanine lagen jedoch noch keine Angaben vor. Im Kapitel "Covalent Fluorescent Probes" von Haugland im Buch von STEINER (1983) werden einige Faustregeln zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Proteinen gegeben.

Haugland empfiehlt, mit möglichst hohen Proteinkonzentrationen und unterschiedlichen molaren Konzentrationen an Fluoreszenzfarbstoff zu arbeiten. Als Reaktionsdauer gibt er 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur oder etwa 12 Stunden bei 4⁰C an. Ich habe festgestellt, daß alle von mir untersuchten Sonden (bis auf Ethoxy) nach 2 Stunden Reaktionsdauer bei 25⁰C (im Wasserbad thermostatisiert) zu Ende reagiert hatten.

a) Nicht kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe

Neben den kovalent bindenden gibt es noch eine Reihe nicht kovalent bindender Farbstoffe. Diese bestehen meist aus höher

kondensierten aromatischen Ringsystemen wie Naphtalin-, Anthracen- und Phenanthrenderivaten. Die fluoreszierenden Ringsysteme lagern sich in hydrophobe Bereiche von globulären Proteinen ein, ANS bindet zum Beispiel in der Hämtasche des Hämoglobins. Ändert das Protein seine Konformation, kann es zu einer teilweisen oder völligen Verdrängung des fluoreszierenden Stoffes kommen, was Änderungen in der Fluoreszenzintensität und des Emissionsmaximums zur Folge hat. Denn nur der gebundene Farbstoff fluoresziert stark, der frei gelöste ist meist nur sehr schwach nachweisbar. Diese Eigenschaft hat auch zur Folge, daß man ungebundenen Farbstoff vor Fluoreszenzmessungen nicht vom Protein abzutrennen braucht. Man sollte ihn im Gegensatz zu kovalent bindenden Reagentien sogar in der Lösung belassen, da die Möglichkeit besteht, daß der Farbstoff in der zweiten, nach dem eigentlichen Markieren hergestellten Konformation besser bindet als in der Ausgangskonformation.

Als nicht kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe wurden von mir ANS und TNS, die 2 bzw. 3 Ringsysteme enthalten, getestet. Beide Farbstoffe banden gut an Hämocyanin, wobei die Fluoreszenz-emissionsspektren aber in beiden Fällen keine Verschiebung des Maximums bei der Oxygenierung bzw. Desoxygenierung des Hämocyanins anzeigten. Die Fluoreszenzintensitäten änderten sich ebenfalls nur geringfügig, so daß im Hinblick auf die Aufgabenstellung aus diesen beiden Sonden kein weiterer Nutzen gezogen werden konnte. In den Abbildungen 4 und 5 sind die entsprechenden Fluoreszenzspektren des ANS- und TNS markierten Hämocyanins dargestellt.

b) Kovalent bindende Fluoreszenzfarbstoffe

Zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung von Proteinen bieten sich im wesentlichen 3 Gruppen an: Carboxylgruppen, Aminogruppen und Sulfhydrylgruppen.

Wegen der geringen Nucleophilität des Carboxylatanions ist ein direktes Markieren von COO^- -Gruppen sehr schwierig und wurde bis jetzt auch noch nicht erreicht. Diese Gruppen müßten erst durch Bindung eines Amins mit Carbodiimid als Katalysator aktiviert werden. Dabei besteht aber die Gefahr einer Quervernetzung des

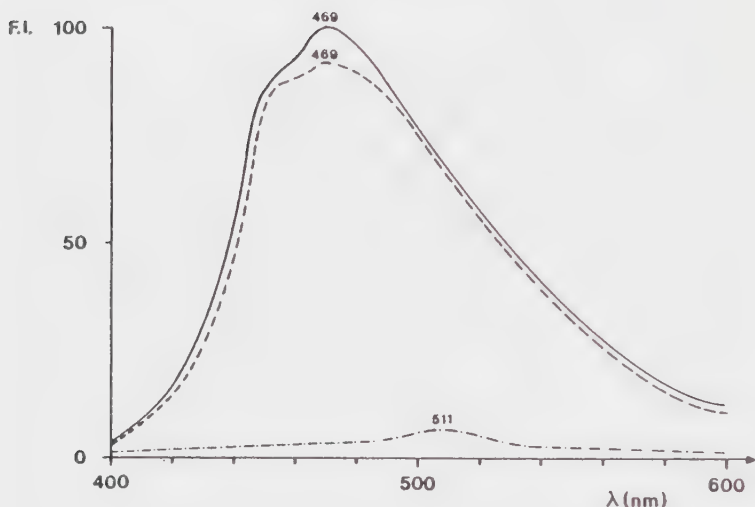


Abb. 4: 37S Hc + TNS (5-facher molarer Überschuß an TNS über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (---), deoxi-Hc (-.-) und 3% TNS-Lösung (....), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,8; $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm, $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml. $S_1 = S_2 = S_3 = S_4 = 1,25$ mm.

Proteins. Theoretisch denkbar wäre eine Reaktion z.B. mit NBD-aziridin, für die aber sehr niedrige pH-Werte, bei denen das Hämocyanin ausfällt, nötig wären. Wegen dieser Schwierigkeiten verzichtete ich auf Versuche, Carboxylgruppen zu markieren.

Damit Aminogruppen mit einer Sonde reagieren können, müssen sie in unprotonierter Form vorliegen. Für die ϵ -Aminogruppe von Lysinresten liegt der pK_a -Wert bei über 10, was bedeutet daß sie bei pH 7 zu mehr als 99% protoniert sind. Dies ändert sich erst dann nennenswert, wenn der pH auf Werte über 9 angehoben wird. Ab pH 9 beginnt jedoch das Hämocyanin in seine Untereinheiten zu dissoziieren. Tris-Puffer kommt bei dieser Reaktion nicht in Betracht, da im Tris ebenfalls Aminogruppen vorliegen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff reagieren können. Carbonat-Puffer scheiden ebenfalls aus, da Carbonationen sich mit am Hämocyanin gebundenem Calcium zu unlöslichem CaCO_3 umsetzen würden und so die Tendenz zur Dissozia-

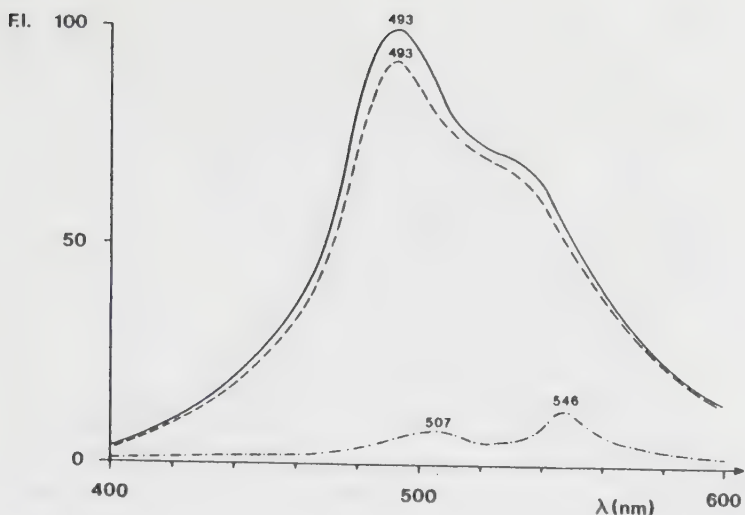


Abb. 5: 37S Hc + ANS (5-facher molarer Überschuß an ANS über Hc). Fluoreszenzemissionsspektrum von oxi-Hc (---), deoxi-Hc (---) und 3% ANS-Lösung (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 389 \text{ nm}$; $c_{\text{Hc}} = 0,02 \text{ mg/ml}$; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25 \text{ mm}$.

tion verstärken würden. Einen Kompromiß stellt der 0,025 M Natrium-boratpuffer pH 8,80 dar, der für die Markierungsreaktionen an ϵ -Aminogruppen des Lysins verwendet wurde. Als erste aminospezifische Sonde wurde Isatosäure kovalent mit Hämocyanin verknüpft. Es band problemlos, und die Fluoreszenzspektren zeigten einen signifikanten Unterschied in der Intensität wenn oxigeniertes und desoxygeniertes markiertes Hämocyanin miteinander verglichen wurde (Abb. 6). Das Emissionsmaximum lag aber in beiden Fällen bei 426 nm; freier Farbstoff zeigte ein sehr viel kürzerwelliges Maximum (401 nm). Das nächste untersuchte Reagenz war Dansylchlorid. Es wurde bei einfacher Zugabe sehr schlecht an Hämocyanin gebunden. Es wurde daher an eine Trägersubstanz (Diatomeenerde, Handelsname "Celite") gebunden und dann mit Hämocyanin versetzt. Das an Celite gebundene Dansylchlorid wird dann langsam wieder abgelöst und ermöglicht so eine schonende

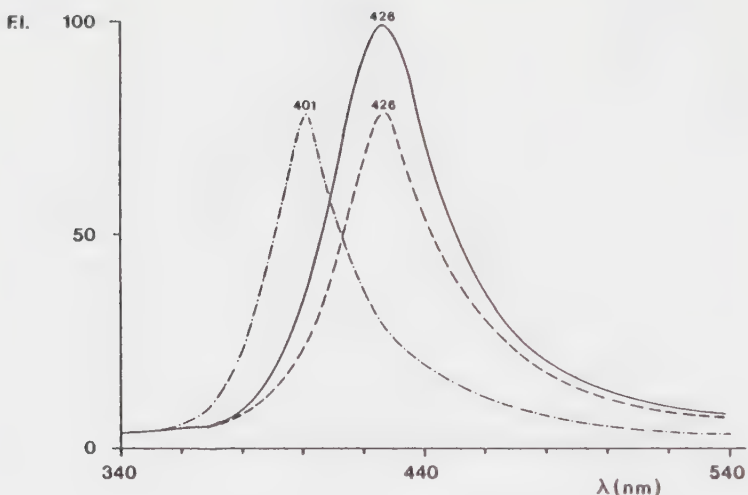


Abb. 6: 37S + Isatosäure (10-facher molarer Überschuß an Isatosäure über Hc). Fluoreszenzemissionspektren von oxi-Hc (---), deoxi-Hc (—) und $3,7 \times 10^{-6}$ M Isatosäure (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 320$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4=1,25$ mm.

Modifizierung des Proteins (OLWIN und STORM, 1983). Die Ausbeute an markiertem Hämocyanin erhöhte sich hierdurch beträchtlich. Bei anderen untersuchten Sonden (Isatosäure, NBD-chlorid) hatte die vorherige Bindung an Celite keine oder sogar negative Auswirkungen auf die Ausbeute des fluoreszenzmarkierten Produkts.

Die Lage der Emissionsmaxima der markierten Hämocyaninproben unterschieden sich nicht im oxigenierten und desoxigenierten Zustand (jeweils 494 nm, Abb.7), die Fluoreszenzintensität ist jedoch im oxigenierten Zustand höher als im desoxigenierten Zustand. Damit ist diese Differenz nicht auf einfaches Sauerstoffquenchen zurückzuführen.

Ein weiterer untersuchter, aminspezifischer Fluoreszenzfarbstoff war Ethoxy. Es bindet nur sehr schwach an Hämocyanin und auch eine vorherige Bindung an Celite erhöhte die Bindungsausbeute nicht.

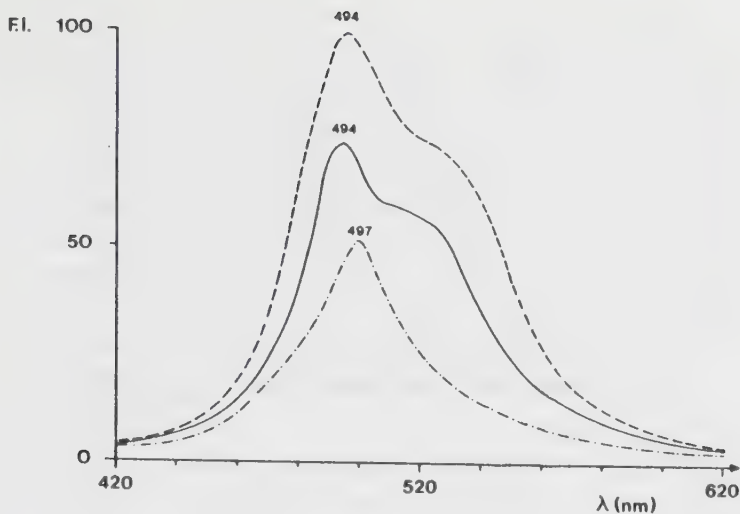


Abb. 7: 37S Hc + 5,1-Dansylchlorid (10-facher molarer Überschuß an Dansylchlorid über Hc; Dansylchlorid an Celite (30% Dansylchlorid, w/w) gebunden). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (---), deoxi-Hc (—) und $2,2 \times 10^{-6}$ M Dansylchlorid (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm; $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm.

Auch eine Verlängerung der Reaktionsdauer auf 12 Stunden bei Raumtemperatur brachte keine besseren Bindungsergebnisse. Der freie Farbstoff zeigt zwei Maxima, von denen eines nach der Bindung an Hämocyanin verschwindet (Abb. 8). Unterschiede sowohl in der Fluoreszenzintensität als auch im Maximum der Emissionswellenlänge waren beim Oxigenieren bzw. Desoxigenieren des Hämocyanins nicht meßbar. Der Fluoreszenzfarbstoff Succinimidyl bindet gut an Hämocyanin. Auch hier liegt wie bei Ethoxy im freien Zustand ein zweigipfeliges Maximum vor, das aber im Gegensatz zu Ethoxy im proteingebundenen Zustand nicht verschwindet. Die Maxima der Fluoreszenzemission sind im oxigenierten und desoxigenierten markierten Hämocyanin und im ungebundenen Fluoreszenzfarbstoff gleich (Abb. 9).

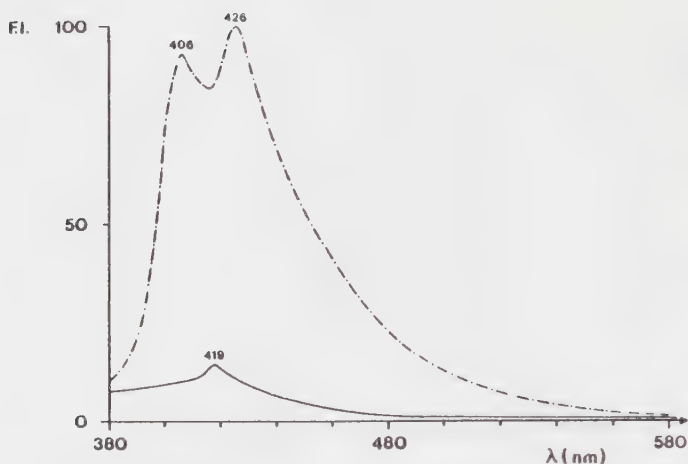


Abb. 8: 37S Hc + Ethoxy (10-facher molarer Überschuß an Ethoxy über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc und deoxi-Hc (---) und $2,1 \times 10^{-6}$ M Ethoxy (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $\lambda_{\text{ex}} = 366$ nm; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm.

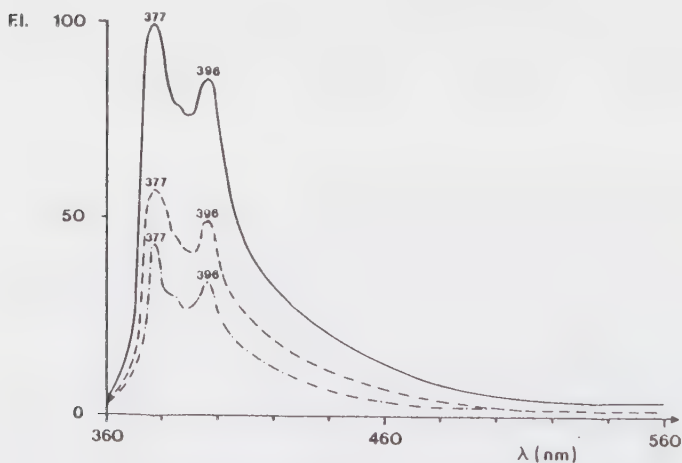


Abb. 9: 37S Hc + Succinimidyl (10-facher molarer Überschuß an Succinimidyl über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (---), deoxi-Hc (---) und 6×10^{-6} M Succinimidyl (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm.

Bei der ersten Lieferung von Succinimidyl, die ich von Molecular Probes erhielt, trat ein zusätzliches, längerwelliges Maximum auf, das sehr interessante fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften aufwies. Zum einen verschob sich die maximale Emissionswellenlänge von 501 nm im oxigenierten Hämocyanin nach 511 nm im desoxigenierten Zustand. Außerdem lag die Fluoreszenzintensität im desoxigenierten Hämocyanin niedriger als im oxigenierten, sodaß ein Sauerstoffquencheffekt für dieses Phänomen ausgeschlossen werden konnten. Das Maximum des freien Fluoreszenzfarbstoffs lag bei 495 nm; Abbildung 10 faßt die Ergebnisse zusammen.

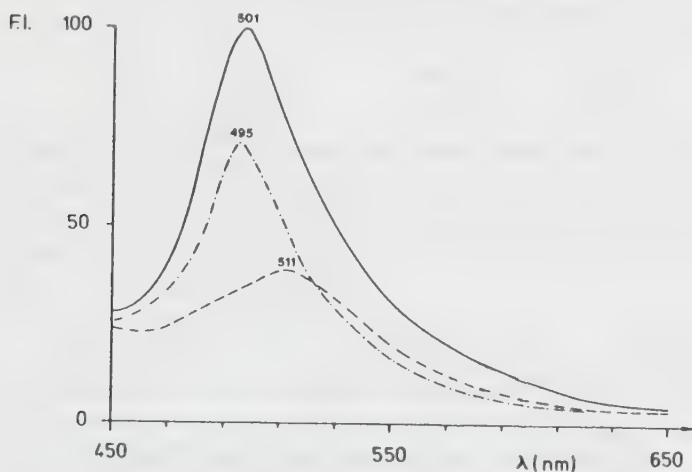


Abb. 10: 37S Hc + Succinimidyl. Bedingungen siehe Abb.9.

Leider ließen sich diese Ergebnisse mit der nächsten und folgenden Chargen an bestelltem Succinimidyl nicht mehr wiederholen. Alle Versuche führten zu Ergebnissen, wie sie in Abb. 9 beschrieben sind. Möglicherweise handelte es sich hierbei um eine Verunreinigung des Fluoreszenzfarbstoffs mit einer weiteren fluoreszierenden Substanz, deren Natur ich aber nicht feststellen konnte. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, daß der Gipfel auch im freien Farbstoff auftrat, was anderen Erklärungen, wie einer möglichen

Excimerenbildung widersprechen würde.

Als letzter aminspezifischer Fluoreszenzfarbstoff wurde von mir NBD-chlorid untersucht. Da es sehr lichtempfindlich ist, müssen alle Reaktionen bis zur endgültigen Abtrennung ungebundenen Materials im Dunkeln stattfinden. In Abbildung 11 ist die Reaktion von NBD-chlorid mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes dargestellt.

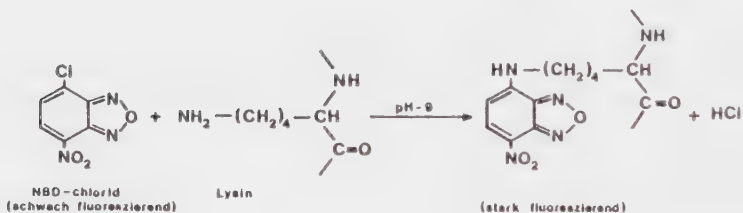


Abb 11: Reaktion von NBD-chlorid mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins.

Denkbar wäre ebenfalls eine Reaktion mit der SH-Gruppe eines Cysteins, jedoch wurden die Markierungsbedingungen so gewählt, daß die Bindung an Aminogruppen bevorzugt abläuft. Außerdem deuten einige spektroskopische Daten, wie ich später noch zeigen werde, auf NH_2 -Gruppen als Bindungsstellen hin.

Das Fluoreszenzemissionsspektrum von Hämocyanin, markiert mit NBD-chlorid, zeigt als Besonderheit eine eindeutige Verschiebung des Maximums in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung des Hämocyanins. Bei pH 7,80 verschiebt sich das Maximum von 531,4 nm nach 535,2 nm. Diese Verschiebung ist reversibel, wie in Abbildung 12 dargestellt.

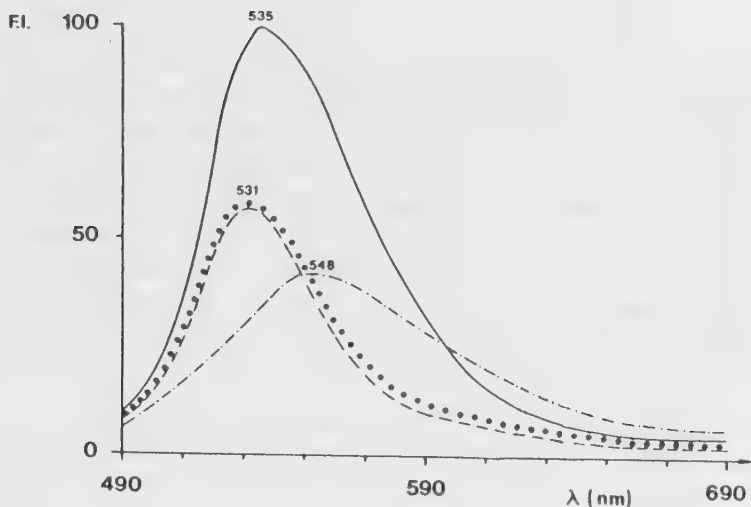


Abb. 12: 37S Hc + NBD-chlorid (10-facher molarer Überschuß an NBD-chlorid über Hc). Fluoreszenzspektren von oxi-Hc (—), deoxi-Hc (---), reoxi-Hc (· · ·) und 2×10^{-4} M NBD-chlorid (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 465$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 0,25$ mm.

Zum Markieren freier SH-Gruppen in Proteinen ist ein pH zwischen 7 und 8 geeignet. In 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80 findet praktisch keine Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an Hämocyanin statt, wahrscheinlich weil Tris wegen seiner nucleophilen Natur bevorzugt mit der Sonde reagiert. Auch hier erwies sich ein 0,025 M Natriumboratpuffer pH 7,50 als sehr hilfreich, obwohl die Pufferwirkung von Borat bei pH-Werten unter 8 nicht sehr ausgeprägt ist.

Die Sonde NBD-aziridin bindet in Boratpuffer gut an Hämocyanin und zeigt einen signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen oxigeniertem und desoxigeniertem Zustand. Das Maximum der Emission liegt aber in beiden Fällen bei 545 nm. Die Emission des freien Farbstoffs ist geringfügig langwelliger (548 nm, wie bei NBD-chlorid). Das Emissionsmaximum bei 545 nm deutet auf eine

Bindung an SH-Gruppen hin; Haugland schreibt (in dem Buch von STEINER, 1983) in dem Kapitel über kovalent bindende Farbstoffe, daß bei NBD-Verbindungen mit Aminogruppen das Maximum zwischen 510 und 540 nm liegt, bei SH-NBD-Verbindungen aber über 540 nm. Sowohl die NH_2 -spezifische Bindung des NBD-chlorid als auch die SH-spezifische Bindung des NBD-aziridin erfüllen diese Voraussetzungen. Trotz der Gemeinsamkeit in der fluoreszierenden Gruppe besitzen beide doch prinzipielle Unterschiede in der Möglichkeit, mit Aminosäureresten in der Kette zu reagieren (Abb. 13, vergl. auch Abb. 11).

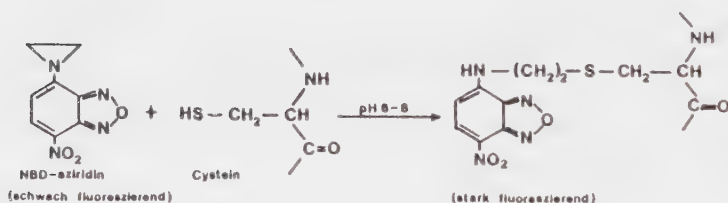


Abb. 13: Reaktion von NBD-aziridin mit Cystein.

In Abb. 14 sind die Fluoreszenzspektren von NBD-aziridin markiertem Hämocyanin und freiem Fluoreszenzfarbstoff dargestellt. Ähnlich wie das Paar NBD-chlorid/NBD-aziridin verhält sich Dansylchlorid/Dansylaziridin. Die Chloride binden jeweils an Aminogruppen, die Aziridine an Sulfhydrylgruppen. Das Dansylaziridin band gut an das Hämocyanin, die Emissionsmaxima lagen im oxigenierten und desoxigenierten Hämocyanin aber jeweils bei 562 nm (Abb. 15). Die beim Markieren mit Dansylchlorid nötige Bindung des Farbstoffes an Celite war bei der Markierung mit Dansylaziridin nicht nötig.

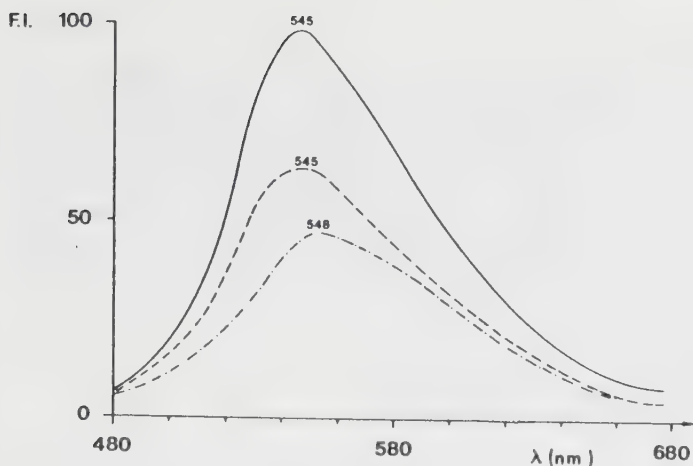


Abb. 14: 37S Hc + NBD-aziridin (10-facher molarer Überschuß an NBD-aziridin über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (— — —), deoxi-Hc (----) und 2×10^{-4} M NBD-aziridin (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 468$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm.

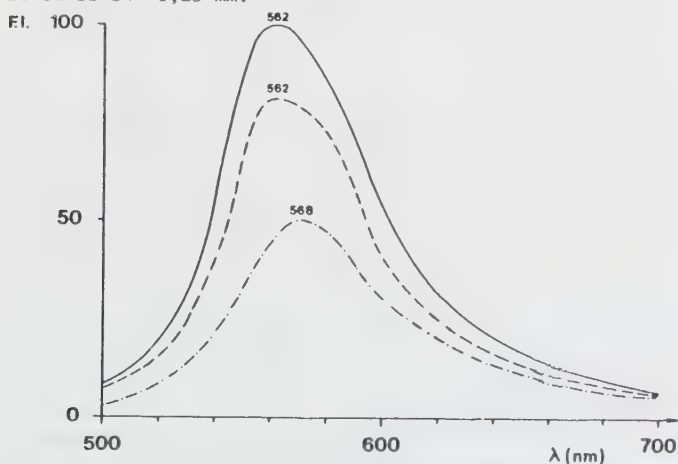


Abb. 15: 37S Hc + Dansylaziridin (10-facher molarer Überschuß an Dansylaziridin über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (— — —), deoxi-Hc (----) und 5×10^{-5} M Dansylaziridin (-.-.-), in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 474$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm.

Ein sehr bekanntes sulfhydrylspezifisches Fluoreszenzreagenz ist 1,5-I-AEDANS. Das gebundene Jod ist sehr lichtempfindlich, und daher müssen alle Vorgänge, an denen ungebundener Farbstoff beteiligt ist, im Dunkeln ablaufen. 1,5-I-AEDANS bindet bei pH 7,5 sehr gut an Hämocyanin, die Intensitätsausbeute ist auch stark von der Oxygenierung abhängig, das Maximum der Emission ist jedoch bei jeder Sauerstoffbeladung gleich (Maximum jeweils bei 504 nm, siehe Abb. 16).

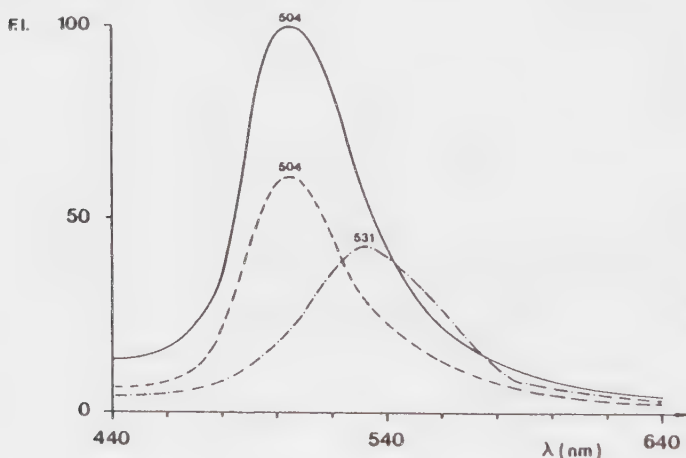


Abb. 16: 37S Hc + 1,5-I-AEDANS (10-facher molarer Überschuß an 1,5-I-AEDANS über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (— — —), deoxi-Hc (---) und $6,7 \times 10^{-6}$ M 1,5-I-AEDANS (-.-.-), in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1 = S_2 = S_3 = S_4 = 1,25$ mm.

IAF ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit einer sehr hohen Quantenausbeute. Er bindet im Dunkeln sehr gut an Hämocyanin und zeigt im gebundenen Zustand ein einheitliches Maximum bei 515 nm. Dieser Farbstoff reagiert nicht mit Intensitätsunterschieden auf eine unterschiedliche Sauerstoffbeladung des Hämocyanins (neben Ethoxy, das aber generell sehr schlecht band, das einzige Mal, daß dieser

Fall auftrat). Das Emissionsmaximum des ungebundenen Farbstoffs liegt bei der gleichen Wellenlänge wie der des gebundenen Farbstoffs, was darauf hindeutet, daß das Label aufgrund seiner Größe in keine hydrophilen Bereiche des Proteins eindringen kann und praktisch immer voll dem Lösungsmittel ausgesetzt ist (Abb. 17).

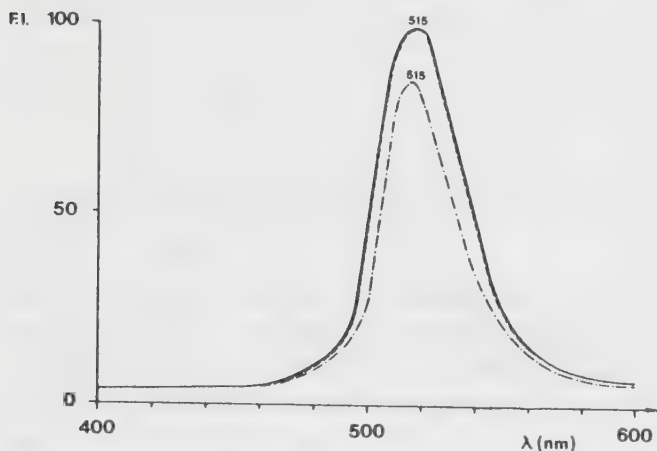


Abb. 17: 37S Hc + IAF (10-facher molarer Überschuß an IAF über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc und deoxi-Hc (----) und 2×10^{-6} M IAF (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 331$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1 = S_2 = S_3 = S_4 = 1,25$ mm.

Die letzten beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die ich untersuchte, waren Pyren und Thiolyte MQ. Pyren hat als fluoreszierende Gruppe die gleiche wie Succinimidyl, die Art der Bindung an das Protein ist jedoch verschieden. Die Emissionsmaxima sind aber denen des Succinimidyls sehr ähnlich. Allerdings trat hier nie ein Maximum bei 500 nm auf, was in meinen Augen ebenfalls darauf hindeutet, daß es sich bei diesem Maximum um eine einmalige Verunreinigung der Charge an Succinimidyl gehandelt haben muß. In Abbildung 18 sind die Emissionsspektren von Pyren-markiertem Hämocyanin wiedergegeben.

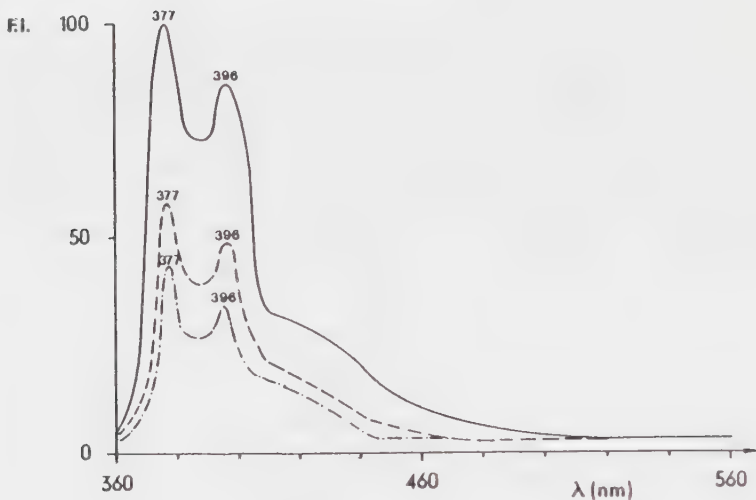


Abb. 18: 37S Hc + Pyren (10-facher molarer Überschuß an Pyren über Hc). Fluoreszenzemissionspektren von oxi-Hc (---), deoxy-Hc (---) und 5×10^{-6} M Pyren (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25$ mm.

Ein völlig neuer Fluoreszenzfarbstoff ist das Thiolyte MQ. Als Besonderheit gilt seine gute Wasserlöslichkeit; es ist in den meisten organischen Lösungsmitteln sogar unlöslich. Man hat hier also die Möglichkeit, ohne Zugabe von organischen Lösungsmitteln, die eine Proteinstruktur stören können, Fluoreszenzmarkierungen durchführen zu können. Thiolyte MQ (es enthält ein labiles Bromatom) bindet im Dunkeln sehr gut an Hämocyanin, allerdings gibt es keine Unterschiede im Emissionsmaximum zwischen oxigeniertem und desoxygeniertem Hämocyanin (Abb. 19).

c) Abtrennung von nicht gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen durch Dialyse und Gelfiltration

Überschüssiger, nichtgebundener Fluoreszenzfarbstoff sollte vor Fluoreszenzmessungen abgetrennt werden, da der Chromophor frei im Puffer gelöst meist andere spektrale Eigenschaften aufweist als am Protein gebunden. Diese Spektren würden dann die eigentlich

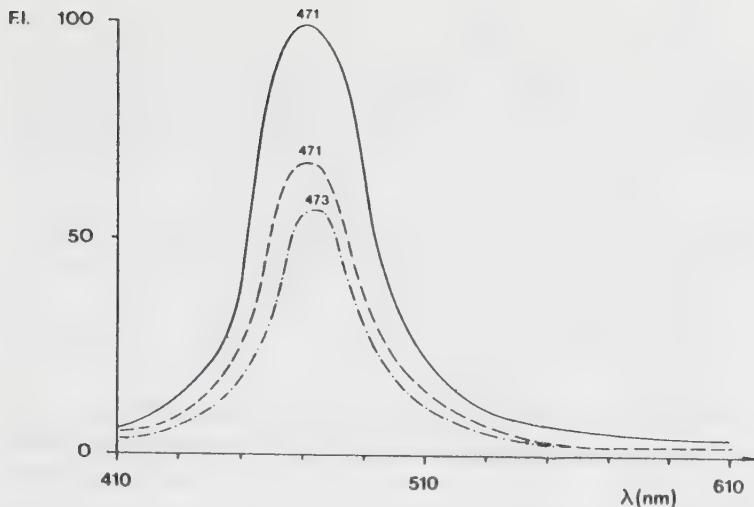


Abb. 19: 37S Hc + Thiolyte MQ (10-facher molarer Überschuß an Thiolyte MQ über Hc). Fluoreszenzemissionsspektren von oxi-Hc (— — —), deoxy-Hc (---) und 3×10^{-4} M Thiolyte MQ (-.-.-), jeweils in 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80; $\lambda_{\text{ex}} = 378$ nm; $c_{\text{Hc}} = 0,02$ mg/ml; $S_1 = S_2 = S_3 = S_4 = 1,25$ mm.

gewünschten überlagern. Zur Abtrennung kann man entweder die Dialyse gegen einen geeigneten Puffer oder eine Gelfiltration verwenden. Zu Kontrollzwecken wurde von einer 2×10^{-4} M NBD-chlorid-Lösung in 0,025 M Natriumboratpuffer, pH 8,8 ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und die Lösung anschließend für 16 Stunden gegen 0,1 M Tris/HCl Puffer, pH 7,80 dialysiert. Nach 4 und nach 8 Stunden wurde der Puffer jeweils gewechselt (hundertfacher Pufferüberschuß gegenüber dem Dialysat). Danach wurde vom Dialysat wieder ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Es war keine Fluoreszenz mehr nachweisbar (Abb. 20).

Der Nachteil der Dialysemethode ist, daß man etwa einen Tag warten muß, um mit dem markierten Material weiterarbeiten zu können. Eine schnellere und ebenso effiziente Methode bietet sich mit der Gelfiltration über Sephadex G 25 s.f. an. Nach etwa 45 Minuten

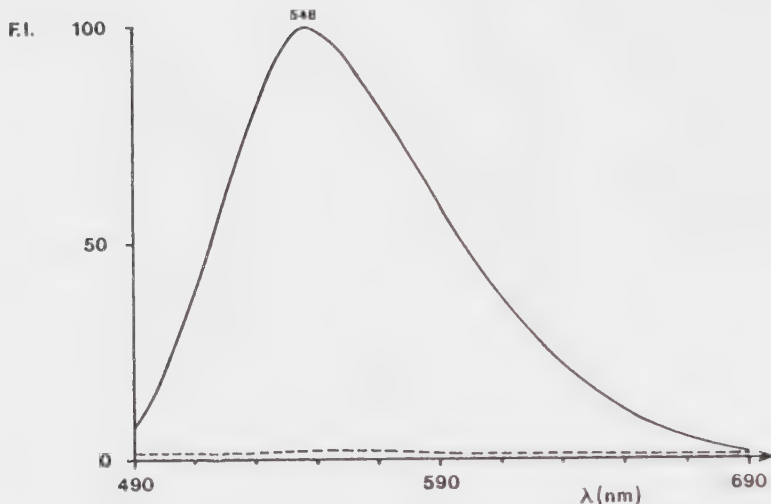


Abb. 20: 2×10^{-4} M NBD-chlorid in 0,025 M Boratpuffer pH 8,8 vor (---) und nach (—) 16 Stunden Dialyse gegen 0,1 M Tris/HCl Puffer pH 7,8. Fluoreszenzemissionsspektren, $\lambda_{\text{ex}} = 465$ nm.

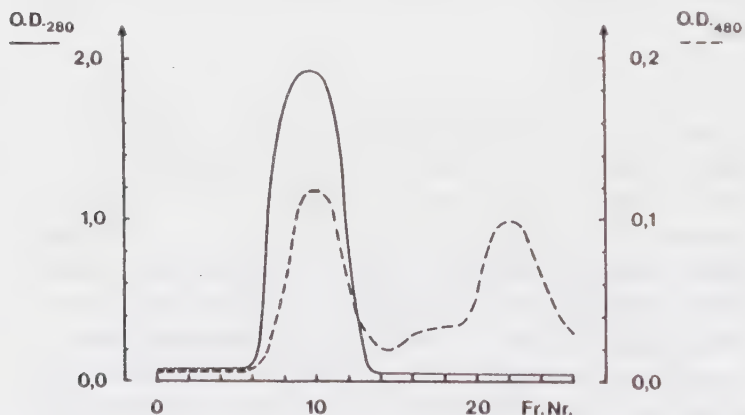


Abb. 21: Abtrennung von ungebundenem NBD-chlorid nach 2 Stunden Markieren mit Hämocyanin ($c_{\text{HC}} = 4,5$ mg/ml; 20-facher molarer Überschuß an NBD-chlorid über Hc) über Sephadex G 25 s.f.. 1 ml-Fractionen, 17 ml/h Durchflußrate. NBD-chlorid absorbiert bei 480 nm, Hämocyanin bei 280 nm.

Tabelle 1: Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen Bindungsversuche am Hc unternommen wurden, sowie die Anregungs- und Emissionsmaxima der gebundenen Sonden. Alle Messungen wurden in einem 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80 durchgeführt.

Fluorophor	$\lambda_{\text{ex,max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em,max}}$ (nm)
1. Nicht kovalent bindende Farbstoffe		
ANS	389	493
bis-ANS	bindet nicht	
TNS	366	469
2. Kovalent bindende Farbstoffe		
a) Aminspezifisch		
AIC	412	513
DAC	387	478
5,1-Dansylchlorid	355	494
2,6-Dansylchlorid	362	507
5,1-Dansylglycin	348	532
5-DTAF	494	521
EITC	519	558
Ethoxy	366	419
FITC	493	526
Isatosäure	320	426
NBD-chlorid	465	531
Succinimidyl	355	377, 396
b) Sulfhydryl-spezifisch		
1,5-I-AEDANS	355	504
1,8-I-AEDANS	358	513
Dansylaziridin	474	562
DMSDS	332	412
IAF	331	515
NBD-aziridin	468	545
Pyren	355	377
Thiolite MQ	378	471

liegt das gereinigte markierte Hämocyanin zur weiteren Verwendung vor. In Abbildung 21 ist eine typische Trennung gezeigt. Man kann dabei durch Voräquilibrieren der Säule und Benutzung des entsprechenden Puffers zur Elution des Hämocyanin immer gleich in den gewünschten Puffer überführen.

In Tabelle 1 sind alle von mir an Hämocyanin gebundenen und auf ihre spektralen Eigenschaften untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe zusammengefaßt.

3. Funktionskontrolle von fluoreszenzmarkiertem Hämocyanin durch Sauerstoffbindungskurven

Die Bindung von fluoreszierenden Farbstoffen an das Hämocyanin kann zu Änderungen der Struktur des Moleküls führen. Bei kovalent bindenden Fluorophoren können Ladungsänderungen auftreten, kovalent bindende sowie nicht kovalent gebundene Farbstoffe können aufgrund ihrer Größe Störungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur bewirken. Deshalb war es wichtig zu untersuchen, inwieweit die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen die Sauerstoffbindung, speziell die Kooperativität des Hämocyanins beeinflusst. Dazu wurden unter definierten Bedingungen markierte Proben (10-facher molarer Überschuß an Farbstoff über Hämocyanin, anschließend Abtrennung ungebundenen Farbstoffs mit Umpufferung auf 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80 über eine Gelfiltrationssäule) mit unbehandeltem Hämocyanin derselben Isolierung verglichen. Hierbei wurde die photometrische Methode der Sauerstoffbindungsmessung der fluorimetrischen Methode vorgezogen, da fluoreszierende Stoffe, die im UV-Bereich emittieren, im letztgenannten Fall die Messungen stören würden. Für NBD-chlorid, das im Sichtbaren seine Fluoreszenzemission zeigt, treten bei der fluorometrischen Methode keine Störungen auf, wie ich später noch zeigen werde. Außerdem wurde der Einfluß von DMF auf die Kooperativität untersucht. Es zeigte sich, daß bis zu 10% DMF im Puffer keinen negativen Einfluß auf die Kooperativität des Hämocyanins haben. In Tabelle 2 sind diese Ergebnisse zusammengefaßt, und in Abbildung 22 sind die Sauerstoffbindungskurven von NBD-

chlorid-markiertem und unbehandeltem Hämocyanin dargestellt.

Die n_{50} -Werte der Sauerstoffbindungskurven werden mit den verwendeten Fluorezenzfarbstoffen um maximal 20% (NBD-aziridin) des Kontrollwertes mit unbehandeltem Hämocyanin erniedrigt. Bei der von mir am meisten verwendeten Sonde NBD-chlorid liegt die Kooperativitätserniedrigung bei knapp 10% (8 und 10%). Diese Einschränkung der Funktionalität des Hämocyanins bei der Verwendung von extrinsischen Fluoreszenzsonden muß man für die weiteren

Tabelle 2: Sauerstoffbindungskurven von unbehandeltem, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiertem und mit DMF versetzten Hämocyanin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80.

1. Versuchsreihe	n_{50}	$n_{\max}$	% Kontrolle	
			(n_{50})	P_{50} (Torr)
Referenz (37S Hc, 1,8 mg/ml)	5,2	5,8	--	17,4
37S + NBD-chlorid	4,8	5,5	92	18,5
37S + Dansylchlorid	4,6	5,0	89	18,9
37S + ANS	4,9	5,5	94	17,9
37S + 1,8-I-AEDANS	4,7	5,0	90	18,2
37S + Isatosäure	4,4	4,8	85	16,3
37S + NBD-aziridin	4,2	4,8	81	17,5
37S + Succinimidyl	4,3	5,4	84	18,3
37S + 10% DMF	5,1	5,7	98	17,9

2. Versuchsreihe				
Kontrolle. (37S Hc, 2,0 mg/ml)	7,2	7,2	--	19,2
37S + NBD-chlorid	6,5	6,7	90	19,6
37S + Dansylchlorid	6,6	6,7	92	18,7
37S + 1,8-I-AEDANS	6,4	6,6	89	18,2
37S + Isatosäure	6,2	6,4	86	18,9

Versuche akzeptieren. Erwartungsgemäß beeinträchtigt der nicht kovalent bindende Farbstoff ANS die Kooperativität am geringsten, leider ist ANS aber für die Untersuchung von verschiedenen Konformationszuständen des Hämocyanins nicht geeignet.

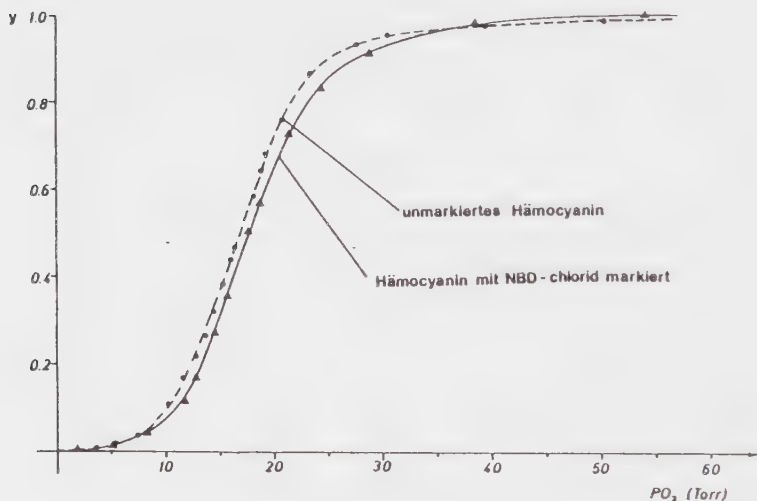


Abb. 22: Sauerstoffbindungskurven von unbehandeltem Hc (---) und NBD-chlorid markiertem Hc (---) in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80. Die Kurven entsprechen denen aus Tab. 1, 1. Versuchsreihe.

4. Kontrollversuche zu NBD-chlorid

Zu NBD-chlorid als konformationsspezifischer Sonde für das Hämocyanin wurden eine Reihe von Kontrollversuchen durchgeführt. Es sollte ausgeschlossen werden, daß das NBD-chlorid auch ohne Bindung an das Hämocyanin bei Oxygenierung bzw. Desoxygenierung sein Fluoreszenzspektrum ändert.

a) pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von NBD-chlorid in Puffer

Bei 3 pH-Werten (7,00; 7,80; 8,50) wurden unter N₂, bzw. unter O₂ die Fluoreszenzspektren von 5×10^{-4} M NBD-chlorid in 0,1 M Tris/HCl-Puffer gemessen. Das Einbringen des Fluoreszenzfarbstoffs

in den Puffer und das Begasen erfolgte im Dunkeln. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Hämocyanin in der Lösung wurde beim Begasen das Stickstoff/Argon-Gemisch bzw. der Sauerstoff nicht auf die Oberfläche der Flüssigkeit in der Küvette geblasen, sondern der einleitende Schlauch in den unteren Teil der Küvette eingetaucht und das Gas durch die Lösung geperlt.

Die Versuche zeigten, daß der Fluoreszfarbstoff zwar mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität, nicht aber mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums auf eine Desoxygenierung reagierte. Das Maximum lag bei allen drei pH-Werten bei 548 nm, auch der Intensitätsunterschied zwischen der oxigenierten und desoxygenierten Lösung war immer sehr ähnlich ($FI_{\text{desoxi}} = 100\%$, $FI_{\text{oxi}} = 73$ bis 77%). Diese Intensitätsabnahme beruht auf dem Quencheffekt des Sauerstoffs. Stellvertretend für alle drei untersuchten pH-Werte ist deshalb in Abbildung 23 der Verlauf der Fluoreszenzkurven bei pH 7,00 angegeben.

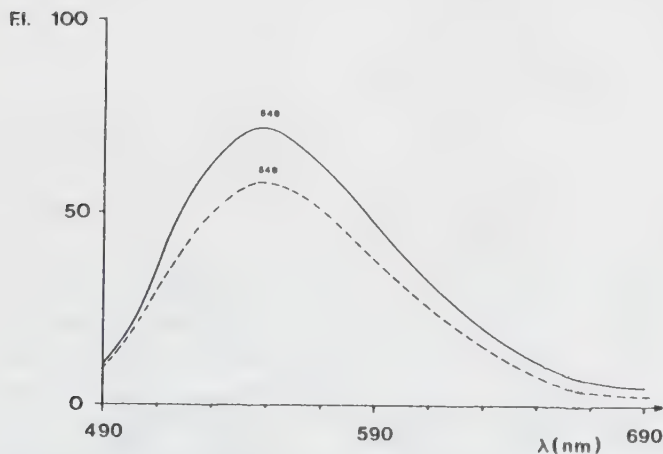


Abb. 23: 5×10^{-4} M NBD-chlorid in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,00; Fluoreszenzemissionsspektren; $\lambda_{\text{ex}} = 465$ nm; $S_1=S_2=S_3=S_4 \approx 1,25$ mm; oxi (— — —), deoxi (---).

b) pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz von NBD-chlorid nach Bindung an Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin wurde unter denselben Bedingungen wie Hämocyanin mit einem 10-fachen molaren Überschuß an NBD-chlorid versetzt (2 Stunden, bei 25⁰C, mit darauffolgender Abtrennung ungebundenen Farbstoffs über eine Sephadex G 25 s.f.-Säule). Die Kurven der oxigenierten Lösung wurden nach Begasung mit 100% Sauerstoff aufgezeichnet, desoxigeniert wurde wieder nach der tonometrischen Methode, und anschließend das Fluoreszenzspektrum bestimmt. NBD-chlorid bindet sehr gut an das Rinderserumalbumin, die Fluoreszenzintensität ist vom Oxigenierungszustand abhängig. Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzspektren bei pH 7,80 (pH 7,00 und pH 8,50 erbrachten die gleichen Resultate). Das Emissionsmaximum war bei allen untersuchten pH-Werten und Sauerstoffdrücken gleich (532 nm). Dies deutet darauf hin, daß die beobachteten Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums von NBD-chlorid-markiertem-Hämocyanin tatsächlich auf Konformationsänderungen am Hämocyanin zurückgehen.

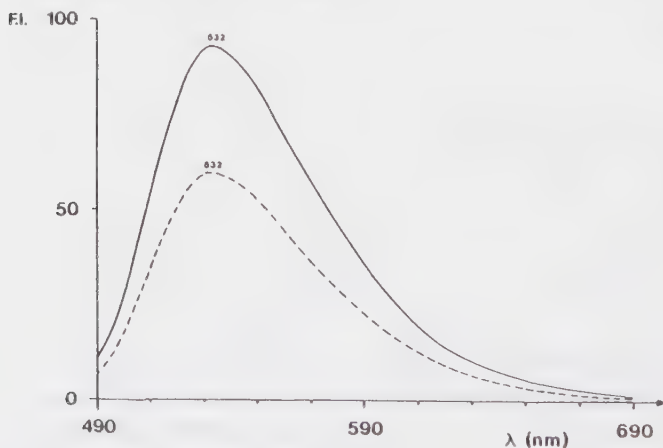
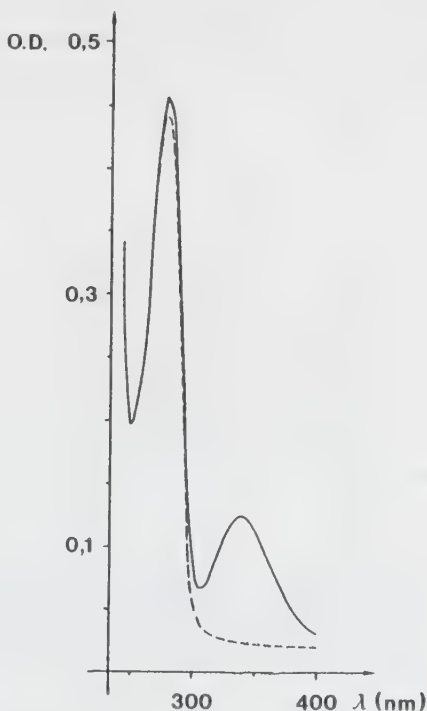


Abb. 24: BSA + NBD-chlorid (10-facher molarer Überschuß an NBD-chlorid über BSA im Markierungsansatz). $\lambda_{ex} = 465 \text{ nm}$; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25 \text{ mm}$; $c_{BSA} = 0,03 \text{ mg/ml}$. Deoxi-BSA (---), oxi-BSA (- - -), 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80.

c) Herstellung von markiertem met-Hämocyanin mit anschließenden
Oxygenierungs-/Desoxygenierungsversuchen

Wird das Cu(I) im aktiven Zentrum durch starke Oxidationsmittel in Cu(II) überführt, verliert das Hämocyanin die Fähigkeit Sauerstoff zu binden. Die Proteinstruktur sollte jedoch aufgrund des Verbleibens des Kupferions im Molekülverband erhalten bleiben. Im Gegensatz dazu besteht bei völliger Entfernung des Kupfers aus dem aktiven Zentrum (apo-Hc) die Gefahr, daß die Struktur des Hämocyanins nachhaltig verändert wird. Eine Kontrolle, ob Hämocyanin noch in der Lage ist Sauerstoff zu binden, ist über die Cu-O₂-UV-Absorptionsbande bei 338 nm möglich. Ein Verschwinden dieser Bande zeigt an, daß am Hämocyanin kein Sauerstoff mehr gebunden ist (Abb. 25).

Abb. 25: UV-Absorptionsspektren von Hc + NBD-chlorid (---) und met-Hc + NBD-chlorid (- - -). Oxygenierung Cu(I) zu Cu(II) im desoxygenierten Zustand bei Raumtemperatur. 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,00; $c_{\text{Hc}} = 0,5$ mg/ml; Zugabe an 3%iger H₂O₂-Lösung 71 μ l für 90 Minuten mit anschließender Dialyse (nach EKKERSKORN, 1986).



ECKERSKORN (1986) untersuchte die Reaktion von H_2O_2 mit Hämocyanin eingehend und fand dabei heraus, daß im alkalischen Bereich der Peak bei 338 nm nie ganz verschwindet, da das Redoxpotential von H_2O_2 im basischen nur etwa halb so hoch ist wie im sauren Bereich. Um im Basischen eine vollständige Oxidation zu erhalten, muß man so viel an H_2O_2 -Überschuß einsetzen, daß das Protein teilweise denaturiert (erkennbar an einer deutlichen Trübung der Lösung). Bei pH 7,00 erreicht man mit einer verträglichen Menge an H_2O_2 eine praktisch vollständige Oxidation des Kupfers. Für die Fluoreszenzmessungen wurde das Hämocyanin dann wieder gegen 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,80 umdialysiert. Das Emissionsmaximum des markierten und unbehandelten Hämocyanins liegt bei 535,2 nm, nach der H_2O_2 -Behandlung und darauffolgender Begasung mit Sauerstoff bei 535,4 nm. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß das Hämocyanin in der gleichen Konformation wie im normal desoxygenierten Zustand vorliegt (Abb. 26).

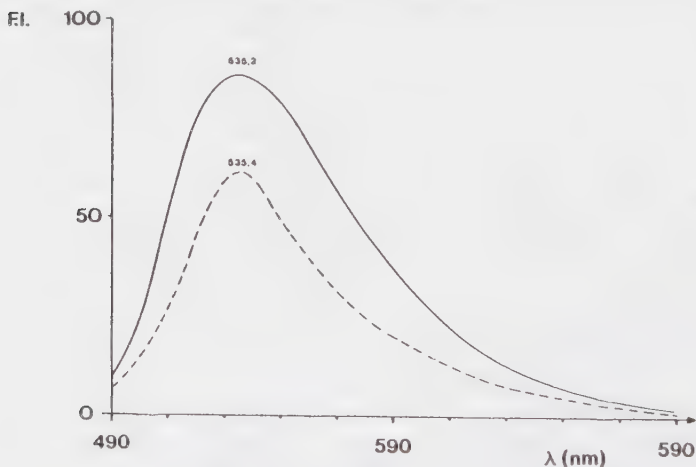


Abb. 26: 37S-Hc + NBD-chlorid desoxygeniert (---) und nach Behandlung mit H_2O_2 mit anschließender Begasung durch O_2 (- - -). 0,1 M Tris/HCl, pH 7,80; $c_{Hc} = 0,02$ mg/ml (siehe auch Abb. 25).

d) Bestimmung der optimalen Zeitdauer zur Äquilibration von Hämocyaninlösungen mit bestimmten Gasdrücken

Für die Oxygenierungs-/Desoxygenierungsversuche war es sehr wichtig, genaue und schonende Verfahren für den Gasaustausch zu finden. Die für die kontinuierlichen Sauerstoffbindungskurven verwendete Begasungsapparatur mit Rührer stand mir nicht zur Verfügung. Ein direktes Durchperlen führt auch bei noch so geringem Blasendurchsatz in der Lösung zu Trübungen, d.h. daß das Protein irreversibel denaturiert wird. Die Methode der Wahl war deshalb, die Äquilibration mit verschiedenen Gasgemischen tonometrisch durchzuführen. Um festzustellen, wann der jeweilige Endpunkt erreicht ist, wurde nach bestimmten Zeiten die Peakhöhe bei 340 nm gemessen. Die Bestimmung wurde zweimal durchgeführt, einmal betrug die Endkonzentration an Sauerstoff im Gasgemisch 4,2 % und das andere Mal 0%. In beiden Fällen ist nach 60 Minuten ein Endpunkt erreicht, der auch durch weiteres Zuführen des Gasgemisches nicht mehr unterschritten werden kann (Abb. 27a,b).

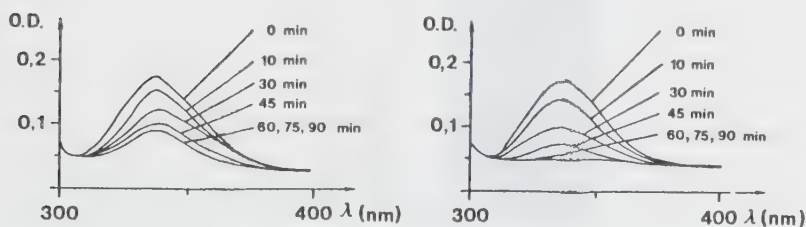


Abb. 27: UV-Absorptionsspektren zwischen 300 und 400 nm von 37S-Hc + NBD-chlorid. a) Endkonzentration an Sauerstoff 4,2%. b) Endkonzentration an Sauerstoff 0%.

5. Bestimmung der gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle am Hämocyanin

WADSWORTH und SLOBODA (1984) markierten Muskelproteine mit einem Fluoresceinderivat. Sie konnten anschließend in einem Polyacrylamidgel, das noch nicht mit Coomassieblau gefärbt worden war, über einer UV-Quelle nachweisen, daß der Fluoreszenzfarbstoff nur an das Tubulin gebunden hatte. Dazu fotografierten sie das Fluoreszenzmuster des Gels und färbten es danach an. Durch einen zweiten Marker auf dem fluoreszierenden Gel konnten sie die entsprechenden Proteine auf dem gefärbten Gel identifizieren. Mit derselben Methode versuchte ich herauszufinden, welche Untereinheiten des Hämocyanins ich mit NBD-chlorid markiert hatte. Ich konnte allerdings bei diesen Versuchen nie eine fluoreszierende Bande in 5-10%igen alkalischen Gelen nachweisen, obwohl eine nachfolgende Proteinfärbung ergab, daß genügend Protein aufgetragen worden war. Der Grund hierfür dürfte in der Anregungswellen-

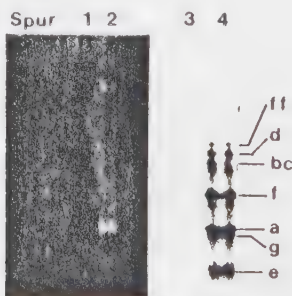


Abb. 28: 5-10%iges, alkalisches Polyacrylamidgel nach Dissoziation 1,5-I-AEDANS-markierten Hämocyanins. Spur 1 und 2 unter Fluoreszenzlicht ($\lambda_{ex} = 302 \text{ nm}$), Spur 3 und 4 nach Proteinfärbung. Man sieht deutlich, daß vor allem die UE a fluoresziert (Identifizierung der Untereinheiten nach SÁVEL, 1979).

länge des mir zur Verfügung stehenden UV-Lichtkastens (302 nm) gelegen haben. NBD-chlorid hat sein Anregungsmaximum bekanntlich bei 465 nm. Nachfolgende Versuche mit 1,5-I-AEDANS markiertem Hämocyanin brachten einen vollen Erfolg. 1,5-I-AEDANS wird bei 355 nm optimal angeregt und emittiert im Sichtbaren bei 494 nm. Hierbei konnte man nach Proteinfärbung genau sehen, welche Untereinheit fluoreszenzmarkiert war (a) und welche nicht (bc, d, e, f, g) (Abb. 28).

Da es mit der vorher beschriebenen Methode nicht möglich war, die markierten Untereinheiten von NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin festzustellen, blieb nur die Möglichkeit, das Hämocyanin zu dissoziieren und die einzelnen Untereinheiten auf die Bindung von NBD-chlorid zu untersuchen. HAUGLAND (1983, S.34) gibt für NBD-chlorid die Extinktionskoeffizienten (ϵ) und die Absorptionsmaxima für verschiedene mögliche Bindungsstellen am Protein an.

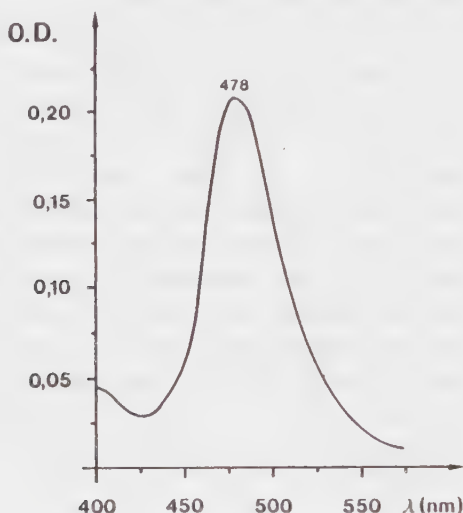
	Absorptionsmaximum (nm)	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
NBD-chlorid/-NH ₂	480	26000
NBD-chlorid/-SH	425	13000
NBD-chlorid/Phenole	382	11400

37S Hämocyanin markiert mit einem 20-fachen Überschuß an NBD-chlorid hat ein eindeutiges Absorptionsmaximum bei 478 nm (Abb. 29). Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß das NBD-chlorid an Aminogruppen gebunden wurde.

Da das Hämocyanin bei 480 nm nicht absorbiert, kann also die Extinktion bei dieser Wellenlänge als direktes Maß für die Konzentration an NBD-chlorid gelten ($\epsilon = 26000 M^{-1}cm^{-1}$). 37S Hämocyanin wurde daher mit NBD-chlorid markiert, ungebundener Farbstoff abgetrennt und vom markierten Hämocyanin die Extinktion bei 480 nm bestimmt. Dieser Ansatz wurde insgesamt mit vier ver-

schiedenen Markierungsverhältnissen gemacht: 12-, 24-, 120- und 480-facher molarer Überschuß an NBD-chlorid gegenüber Hämocyanin. Geht man von 24 Untereinheiten im Molekül aus, so ergeben sich die

Abb. 29: Absorptionsspektrum von 37S Hc + NBD-chlorid; $c_{\text{Hc}} = 3 \text{ mg/ml}$.



Markierungsverhältnisse 0,5-, 1-, 5- und 20-facher Überschuß gegenüber den Untereinheiten. Ein weiteres Problem stellte die genaue Bestimmung der Proteinkonzentration dar. Da NBD-chlorid bei 280 nm absorbiert, kann man bei dieser Wellenlänge keine genauen Proteinbestimmungen machen. Es wurde daher eine Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) durchgeführt. In einem Vorversuch wurde geklärt, ob NBD-chlorid den LOWRY-Test beeinflusst. Dazu wurde eine Eichkurve mit BSA als Standard angefertigt. Als "unbekannte" Proteinlösung wurden je 2 unbehandelte und mit 20-fachem molarem Überschuß (gegenüber den Untereinheiten, der höchsten nachher eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffkonzentration) markierte Hämocyaninproben eingesetzt. Probe 1 enthielt 0,95 mg/ml Hämocyanin (bestimmt durch $\text{O.D.}_{280} = 0,95$), Probe 2 1,50 mg/ml Hämocyanin ($\text{O.D.}_{280} = 1,50$); Probe 3 war die zweite Hälfte von Probe 1, nur mit der entsprechenden Menge NBD-chlorid versetzt und Probe 4 war

der mit NBD-chlorid umgesetzte Teil der Probe 2. Die mit NBD-chlorid versetzten Proben 3 und 4 wurden nicht von ungebundenem Fluoreszenzfarbstoff abgetrennt, um die Proteinkonzentration weiter genau zu kennen. Es war zu erwarten, daß das NBD-chlorid keinen Einfluß auf die LOWRY-Bestimmung hat, da bei dessen Meßwellenlänge von 578 nm der Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr absorbiert. Tabelle 3 und Abbildung 30 zeigen, daß diese Erwartungen eintrafen. Zuerst wurde nun jeweils die Gesamtmenge an NBD-chlorid, die pro Hämocyaninmolekül gebunden hatte, bestimmt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Das Hämocyanin wurde für zwei Stunden bei 25°C im Dunkeln mit dem Chromophor versetzt; ungebundener Farbstoff wurde anschließend über Sephadex G 25 s.f. abgetrennt. Die Konzentration an Hämocyanin wurde durch den LOWRY-Test, die Konzentration an NBD-chlorid nach $c = E / \epsilon \times d$ (c = Konzentration, E = Absorption bei 480 nm, $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt.

Tabelle 3: Untersuchung des Einflusses von NBD-chlorid markiertem Hc auf den LOWRY-Test. Erklärung der einzelnen Proben im Text.

	O.D. ₂₈₀	O.D. ₅₇₈ (nach LOWRY)	mg Protein (nach LOWRY)
Probe 1	0,95	0,41	0,88
Probe 2	1,50	0,67	1,44
Probe 3	0,95	0,415	0,88
Probe 4	1,50	0,64	1,42

Bei einem Markierungsansatz von 0,25:1 (bezogen auf die Untereinheiten) bindet praktisch noch kein NBD-chlorid, verdoppelt man die NBD-chlorid-Menge im Ansatz, so binden schon etwa 3 NBD-Moleküle pro Hämocyaninmolekül. Mit diesen beiden Farbstoffkonzentrationen wurden die Versuche dreimal durchgeführt, um eine größere Sicherheit dieses Sprunges im Bindungsverhalten zu belegen (Tabelle 3). Erhöht man die Chromophorkonzentration im Markie-

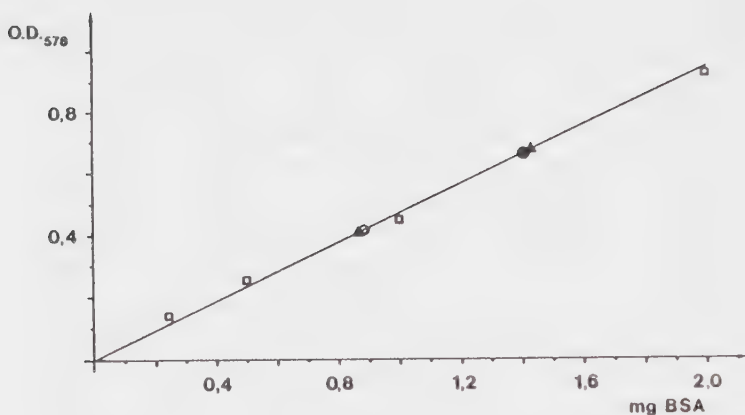


Abb. 30: Eichkurve des LOWRY-Tests, NBD-chlorid markierte (○, ●) und unmarkierte Hämocyaninproben (Δ, ▲).

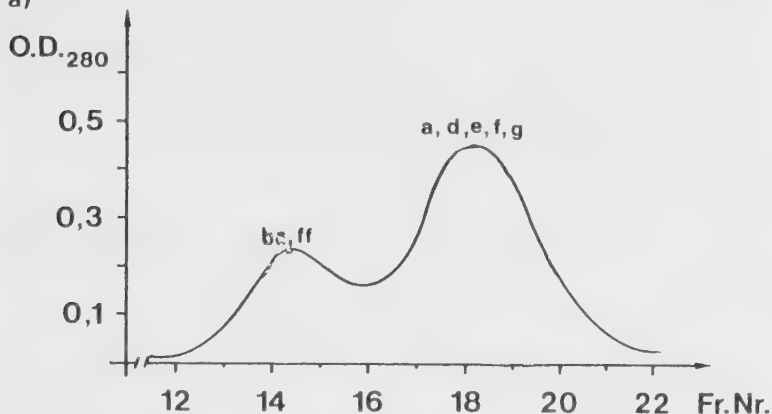
Tabelle 4: Bestimmung der Markierungsrate am Gesamthämocyanin bei verschiedenen Konzentrationen an NBD-chlorid im Ansatz. Das Gesamtmolekül enthält 24 Untereinheiten, das Molekulargewicht einer Untereinheit wurde mit 70000 D angenommen.

<u>Mol NBD-chl</u>	<u>Mol NBD-chl</u>	Vers. 1	Vers. 2	Vers. 3	<u>Mol NBD-chl</u>
Mol UE	Mol Hc				Mol Hc
0,25:1	6:1	0,21	0,08	0,02	0,10
0,5:1	12:1	3,04	2,81	3,03	2,96
0,83:1	20:1	4,28	3,96	----	4,12
1:1	24:1	3,68	4,84	----	4,26
5:1	120:1	11,22	10,58	----	10,90
20:1	480:1	17,50	19,30	----	18,40

rungsansatz weiter, so steigt auch die Zahl der gebundenen Farbstoffmoleküle weiter. Ist das NBD-chlorid/Untereinheitenverhältnis

1:1, dann binden insgesamt etwa 4 NBD-chloridmoleküle am Hämocyanin, bei 5:1 sind es 11 und bei 20:1 18 NBD-chloridmoleküle. Interessant ist in diesem Zusammenhang vielleicht die Tatsache, daß man die Veränderungen des Fluoreszenzspektrums zwischen oxigeniertem und desoxigeniertem Zustand sowohl beim Markierungsansatz 0,5:1 wie auch beim Ansatz 20:1 nachweisen kann. Das heißt,

a)



b)

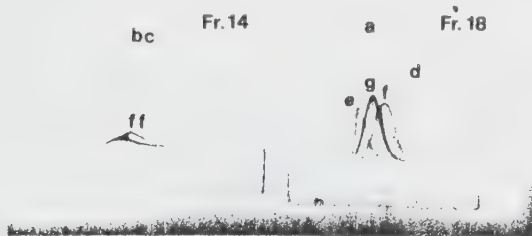


Abb. 31: a) Monomeren/Dimeren-Trennung über Ultrogel AcA 44 (2 m x 0,8 cm); Durchflußrate 4 ml/h, 60-min Fraktionen, 4⁰C; Elutionspuffer Glycin/NaOH pH 9,6 + 10 mM EDTA; Markierungsverhältnis 20:1, für die anderen Ansätze ergaben sich identische Trennbilder. b) Zweidimensionale Immunelektrophorese der Fraktionen 14 und 18 der Monomeren/Dimeren-Trennung.

daß die "entscheidenden" Moleküle NBD-chlorid, die auf die Konformationsänderung reagieren, bereits unter den 3 Molekülen zu finden sind die relativ leicht gebunden werden. Der darüberhinaus gebundene Fluoreszenzfarbstoff erhöht nur die Fluoreszenzintensität, trägt aber zu einer weiteren Wellenlängenverschiebung nicht mehr bei.

Interessant war natürlich nach diesen Ergebnissen herauszufinden, wie die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffmoleküle auf die einzelnen Untereinheiten verteilt waren. Dazu wurden die jeweiligen Ansätze zur Dissoziation gegen Glycin/NaOH-Puffer pH 9,6 + 10 mM EDTA dialysiert und über eine Ultrogel AcA 44-Säule die Monomeren von den Dimeren getrennt (Abb. 31a).

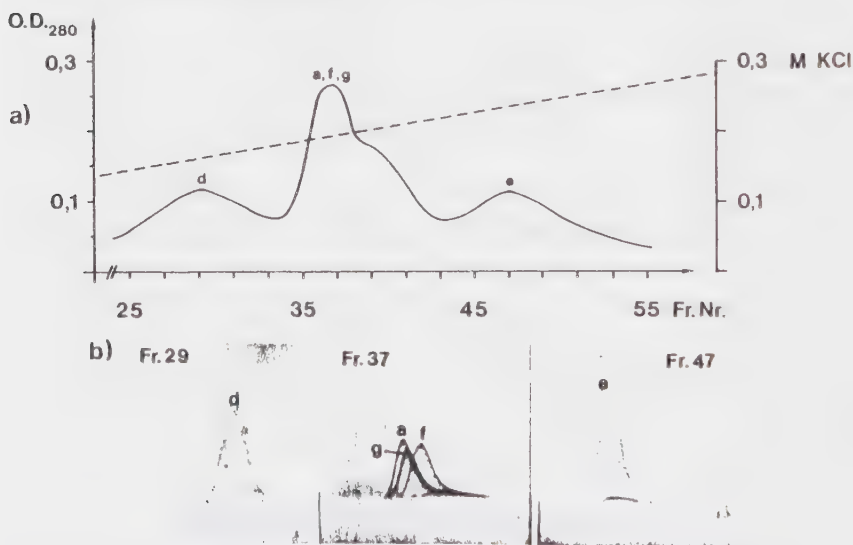


Abb. 32: a) Monomerentrennung über DEAE-Sepharose Cl 6 B (20 cm x 0,8 cm). Durchflußrate 1,6 ml/h, 60- min-Fractionen, 4°C . 0,1 M bis 0,3 M linearer KCl-Gradient in 0,05 M Tris/HCl-Puffer + 1 M Harnstoff + 1 mM EDTA (60 ml + 60 ml). NBD-chlorid : UE 0,5:1, für die anderen Ansätze ergaben sich identische Trennbilder. b) Zweidimensionale Immunelektrophoresefolien der Fraktionen 29, 37 und 47 der Monomerentrennung.

Die Dimeren- und Monomerenfraktionen wurden mittels der zweidimensionalen Immunelektrophorese auf ihre Untereinheiten-zusammensetzung untersucht (Abb. 31b). Die Dimerenfraktionen 12 bis 15 wurden vereinigt und bei 4⁰C aufbewahrt. Die Monomerenfraktionen 17 bis 21 wurden ebenfalls vereinigt und über eine DEAE-Sepharose Cl 6B-Ionenaustauschersäule weiter aufgetrennt. In Abbildung 32a ist das Elutionsprofil einer solchen Trennung dargestellt.

Wie aus Abbildung 32b hervorgeht, sind die Untereinheiten d und e sauber, während a, g und f im Hauptgipfel zu etwa gleichen Teilen vorliegen. Da eine weitere Auftrennung dieser Untereinheiten bis zur völligen Reinheit sehr zeitraubend ist, wurde auf eine weitere Auftrennung verzichtet. Die drei Untereinheiten wurden gemeinsam bei der Berechnung von gebundenem NBD-chlorid gewertet.

Von allen Ansätzen wurden nun die Gipfelfraktionen die d, a g und f sowie e enthielten und die Dimerenfraktionen (siehe Abb. 31) im Photometer auf ihre Extinktion bei 480 nm untersucht und daraus die Konzentration an NBD-chlorid berechnet. Mit dem LOWRY-Test erfolgte dann die genaue Bestimmung der Proteinkonzentration jeder Probe (Tabelle 5).

Tabelle 5: Bindung von NBD-chlorid an einzelne Untereinheiten bzw. Untereinheitengruppen in Abhängigkeit von der der eingesetzten Chromophormenge. Das Molekulargewicht einer Untereinheit wurde mit 70000 D, das von Dimeren mit 140000 D angenommen.

Untereinheiten	Verhältnis NBD-chlorid : Untereinheiten			
	0,5:1	1:1	5:1	20:1
bc/ff	0,2	0,3	0,5	0,8
d	0,5	0,8	1,1	2,0
a, f, g	---	0,1	0,3	0,5
e	---	---	0,2	0,5
pro 24-mer (aus Tab. 4)	3	4	11	18

Man sieht, daß bei der geringsten hier untersuchten Fluorophorkonzentration im Ansatz (0,5:1 gegenüber den Untereinheiten) von den 4 vorhandenen Untereinheiten d bereits 2 markiert sind, während a, e, f und g noch kein NBD-chlorid gebunden haben. Lediglich im Dimerengemisch findet sich noch ein weiteres gebundenes NBD-chlorid-Molekül, wahrscheinlich an den Untereinheiten bc, da f unmarkiert ist. Bei allen weiteren Ansätzen ist immer die Untereinheit d am stärksten markiert, beim Verhältnis 20:1 sind es 2 NBD-chlorid-Moleküle pro Untereinheit d. Bei dieser hohen Konzentration im Ansatz bindet das NBD-chlorid an alle Untereinheiten, allerdings binden an die Untereinheit d immer am meisten NBD-chlorid-Moleküle. Als nächstes wurde deshalb versucht, eine markierte Untereinheit d in ein Molekül mit allen anderen unbehandelten Molekülen einzubauen und anschließend Fluoreszenzmessungen und Sauerstoffbindungskurven mit diesem Material zu machen.

6. Versuche zum Einbau der markierten Untereinheit d in ein 24-meres Hämocyaninmolekül mit den nicht markierten Untereinheiten a, bc, e, f, und g

Die Gewinnung der gereinigten, fluoreszenzmarkierten Untereinheit d ist im vorhergehenden Abschnitt beschrieben worden. Es wurde bei diesem Versuch mit einem Verhältnis NBD-chlorid : Hämocyanin von 12:1 im Markierungsansatz gearbeitet. Die übrigen Untereinheiten wurden dadurch gewonnen, daß unmarkiertes Hämocyanin dissoziiert wurde, eine Monomeren/Dimeren-Trennung durchgeführt wurde und anschließend die Monomeren weiter aufgetrennt wurden. Aus dieser Monomerenfraktion wurde die Untereinheit d durch Affinitätschromatographie an einer Antikörpersäule entfernt. Dann wurden die einzelnen Untereinheiten wieder etwa entsprechend ihrem Verhältnis im nativen Hämocyaninmolekül zusammengemischt, a, bc, e, f, ff und g unmarkiert sowie NBD-chlorid markierte Untereinheit d. Die

Reassoziation erfolgte für 72 Stunden durch Dialyse gegen einen 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,8, dem 5 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} zugesetzt waren. Da trotz sorgfältiger Berechnung der Untereinheitenzusammensetzung im Ausgangsgemisch nicht damit zu rechnen war, daß das Hämocyanin quantitativ reassoziert, mußten unvollständig assoziierte Produkte vom 37S-Hämocyanin abgetrennt werden. Diese Abtrennung erfolgte über eine Biogel A5m-Säule, das Trennbild ist in Abbildung 33 dargestellt.

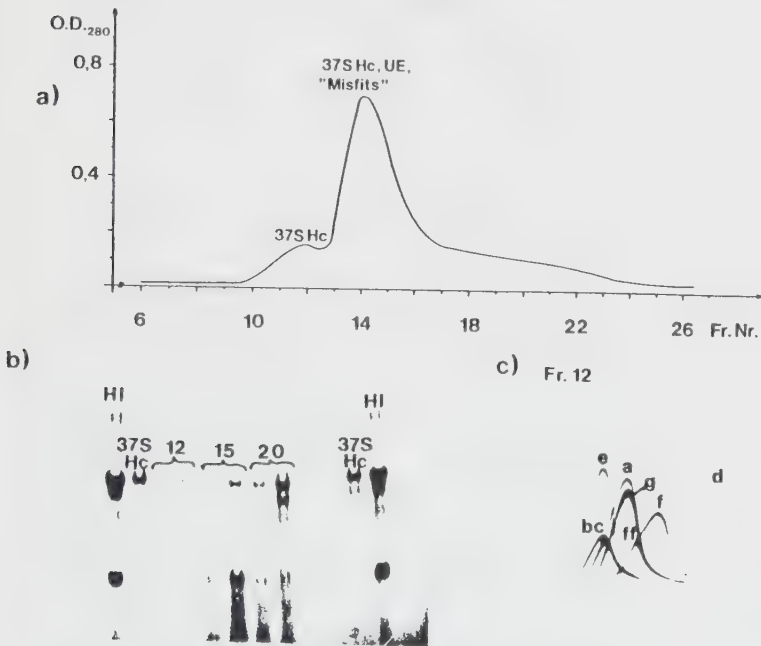


Abb. 33. a) Reinigung von reassoziertem 37S Hc (mit markierter UE d) über eine Biogel A5m-Säule (60 cm x 1,0 cm); 20 ml/h Durchflußrate, 1-ml-Fractionen, 4°C . b) 3,7%iges Polyacrylamidgel HI= Hämolymph, Fr. 12, Fr. 15 und Fr. 20 aus der Biogeltrennung (siehe a). c) Zweidimensionale Immunelektrophorese der Fr. 12 der Biogeltrennung (siehe a).

In der PAGE kann man gut erkennen, daß in Fraktion 12 (Abb. 33b) gereinigtes, reassoziertes 37 S Hämocyanin vorliegt. Im Hauptgipfel (Fr. 15, Abb. 33a) befindet sich zwar auch noch eine größere Menge an richtig reassoziertem Protein, allerdings deutet die verschmierte Bande an, daß auch viele Fehl ASSOZiate und freie Dimere und Monomere mitvorhanden sind. Ein geringer Teil des Reassoziats wurde wieder gegen Glycin/NaOH-Puffer pH 9,6 + 10 mM EDTA dissoziiert und in der zweidimensionalen Immunelektrophorese untersucht. Hier zeigte sich, daß alle Untereinheiten wieder im richtigen Verhältnis vorhanden waren (Abb. 33c). Man kann also davon ausgehen, daß in Fraktion 12 korrekt reassoziertes Hämocyanin vorliegt, bei dem nur die Untereinheit d fluoreszenzmarkiert ist.

Von dem so gewonnenen 37S-Hämocyanin wurde dann ein UV-Spektrum aufgenommen, da dessen Verlauf schon Hinweise auf die Intaktheit des Materials gibt. Wie zu befürchten war, deutete sich hierbei schon eine relativ starke Schädigung des Hämocyanins an. Der Peak bei 338 nm war im Vergleich zum Maximum bei 280 nm zu niedrig (was auf Kupferverluste im Protein hinweist) und das Minimum bei 250 nm war zu hoch (ein Anzeichen für Denaturierung, Abb. 34).

Zur genaueren Kontrolle des Materials wurde auch noch von einem Aliquot eine Sauerstoffbindungskurve angefertigt. Der maximale Hillkoeffizient des markierten Ausgangsmaterials betrug vor der Dissoziation 5,6 ($n_{50} = 5,0$, $p_{50} = 19,5$ Torr), die Kooperativitätswerte für das unmarkierte Hämocyanin lagen geringfügig höher ($n_{\max} = 5,8$, $n_{50} = 5,4$) und die Sauerstoffaffinität war etwas höher ($p_{50} = 18,4$ Torr). Das reassozierte Hämocyanin dagegen wies einen $n_{\max}$ von nur noch 2,3 auf ($n_{50} = 2,3$, $p_{50} = 11,2$ Torr). Dies entspricht einer Kooperativitätseinbuße von etwa 60%, bezogen auf die maximalen Hillkoeffizienten der Ausgangsproteine. Dieses Ergebnis nimmt den folgenden Fluoreszenzversuchen mit diesem Material natürlich viel von ihrer Aussagekraft.

Das Emissionsspektrum zeigt praktisch keine Änderung des Maximums in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung (wie das im intakten Molekül der Fall ist). Das Fluoreszenzspektrum weist gegenüber

nicht dissoziiertem und reassoziertem, NBD-chlorid-markierten Hämocyanin eine Schulter im Bereich von etwa 538 nm auf (Abb. 35). Diese Schulter zum langwelligen Bereich deutet darauf hin, daß ein Teil des gebundenen NBD-chlorids dem Lösungsmittel stärker ausgesetzt ist als im intakten Molekül. Es spricht deshalb vieles dafür, daß die Untereinheit d nicht mehr intakt ist. Da die

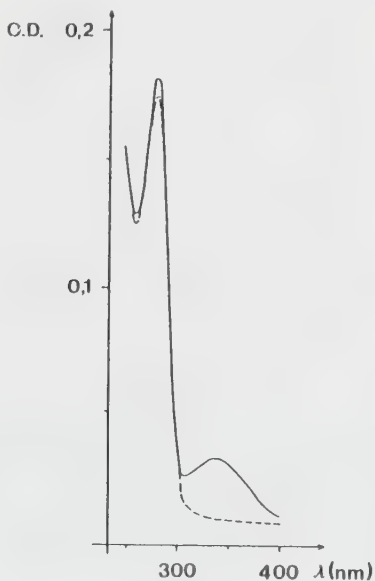


Abb. 34: UV-Spektrum von 37S-Hc mit NBD-chlorid markierter UE d nach Reassoziaton und Reinigung der Reassoziationsprodukte. (—) oxo-Hc, (---) deoxy-Hc.

anderen Untereinheiten derselben Behandlung unterworfen wurden, dürften auch sie mehr oder weniger geschädigt worden sein. Das ins langwellige verschobene Maximum im oxigenierten Zustand könnte durch die mangelnde Sauerstoffbindungsfähigkeit aufgrund von Kupferverlust bedingt sein. Mit Hilfe dieses Versuches war es also nicht möglich festzustellen, ob die Änderung zwischen oxigeniertem und desoxigeniertem Fluoreszenzemissionsmaximum auf eine Konformationsänderung zurückging.

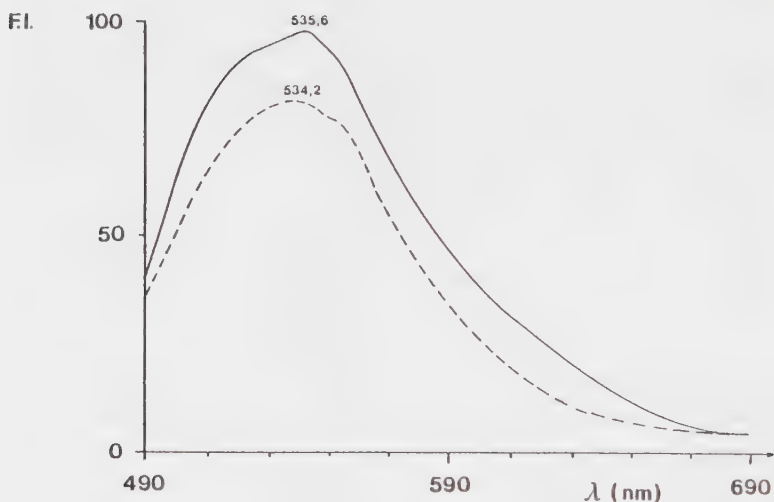


Abb. 35: Fluoreszenzspektren von reassoziertem 37S Hc mit NBD-chlorid markierter Untereinheit d. (---) oxy-Hc, (—) deoxy-Hc. $c_{\text{Hc}} = 0,02 \text{ mg/ml}$; $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$; $S_1=S_2=S_3=S_4 = 1,25 \text{ mm}$; $0,1 \text{ M}$ Tris/HCl-Puffer, pH 7,80. Vergleiche auch Abb. 12, in der die Versuche mit intaktem Hämocyanin gezeigt sind.

7. Fluoreszenzmessungen mit NBD-chlorid markierten Hämocyanin-lösungen

In Abbildung 36 ist das Anregungsspektrum von NBD-chlorid markiertem Hämocyanin wiedergegeben. Es sollte sich mit dem Absorptionsspektrum decken. Ein Vergleich mit Abbildung 29 zeigt, daß dies im wesentlichen zutrifft, obwohl die Maxima um etwa 13 nm auseinanderliegen. Der übrige Verlauf der Kurven ist jedoch sehr ähnlich.

Im Kapitel über die Suche nach geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen

für die Untersuchung von Konformationsänderungen sind auf Abbildung 12 die Fluoreszenzspektren von NBD-chlorid markiertem

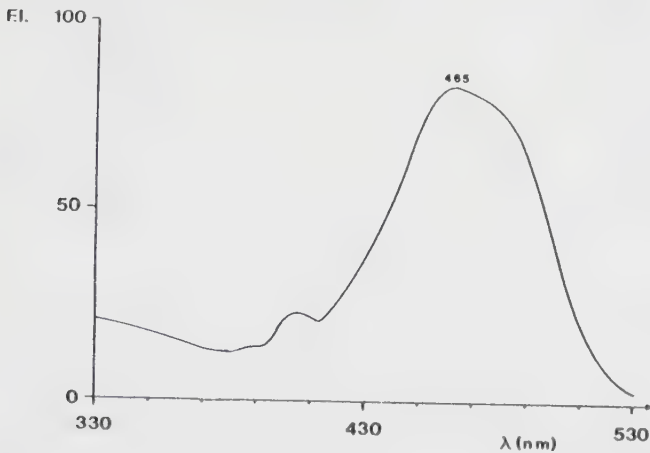


Abb. 36: Fluoreszenzanregungsspektrum von oxigeniertem, NBD-chlorid-markiertem 37S Hc. $\lambda_{em} = 531 \text{ nm}$; $S_1=S_2 = 0,5 \text{ mm}$, $S_3=S_4 = 0,25 \text{ mm}$; $c_{Hc} = 0,02 \text{ mg/ml}$; $0,1 \text{ M Tris/HCl-Puffer, pH } 7,80$.

Hämocyanin im oxigenierten und desoxigenierten Zustand gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte aber vor allem untersucht werden, wie das Konformationsverhalten des Hämocyanins bei intermediärer Sauerstoffbeladung aussieht, d.h. zwischen den beiden Extremzuständen völliger Sauerstoffsättigung und völliger Sauerstoffentladung. Gibt es bei schrittweiser Sauerstoffsättigung nur zwei nachweisbare Zustände oder sind es mehr, was vor allem bei der Beurteilung der Anwendbarkeit des MWC-Modells eine wichtige Rolle spielen würde. Um dieser Frage nachzugehen, wurden mit einer Wösthoffpumpe Sauerstoff/Argon-Stickstoff-Gemische hergestellt, und das NBD-chlorid-markierte Hämocyanin damit begast. Dann wurden nach der Äquilibrierung mit dem jeweiligen Gasgemisch Fluoreszenzemissionsspektren mit einer Auflösung von $0,2 \text{ nm}$ angefertigt. Ein offener bzw. geschlossener Kreis in den Abbildungen 37, 38 und 39 entspricht einem solchen Meßpunkt. Außerdem wurde mit demselben fluoreszenzmarkierten Protein für

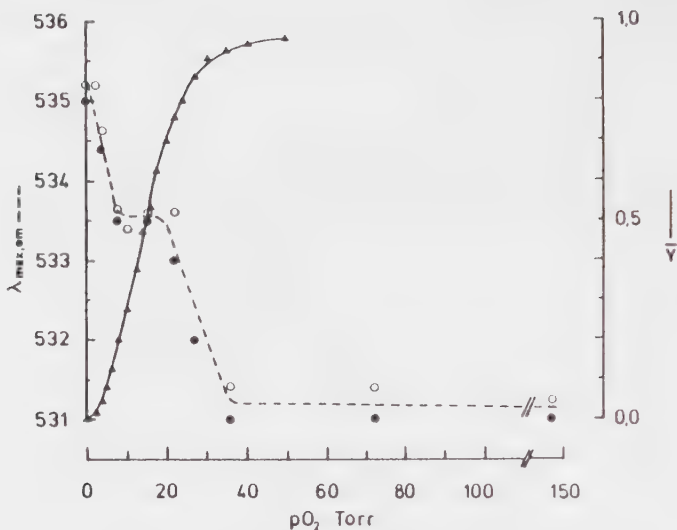


Abb. 37: Verlauf der Sauerstoffbindungskurve ($\blacktriangle$) und des Maximums der Fluoreszenzemission ($\circ, \bullet$) in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck von NBD-chlorid-markiertem Hc in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80.

jeden pH-Wert (7,00; 7,80; 8,50) eine Sauerstoffbindungskurve gemacht und mit in die Abbildungen eingezeichnet. Geschlossene Dreiecke entsprechen einem abgegriffenen Punkt auf der originalen Kurve auf dem Digitalisiertablett. In Abbildung 37 ist das Ergebnis dieser Versuche für den pH-Wert 7,80 dargestellt. Sehr interessant war hier das ausgeprägt zweistufige Abfallen der maximalen Fluoreszenzemissionswellenlänge mit steigender Oxygenierung. Es ist sowohl bei einem Verhältnis NBD-chlorid : Hämocyanin von 12:1 ($\circ$) als auch 120:1 ($\bullet$) nachweisbar. Die Kurve insgesamt ist sehr gut reproduzierbar, die gestrichelte Kurve stellt eine gemittelte Kurve aus den experimentell gewonnenen Daten dar. Bei der Sauerstoffbeladung geht also das Hämocyanin von einer desoxygenierten Form, die durch ein Maximum bei 535,2 nm charakterisiert ist, zunächst in einen Zwischenzustand über (Maximum bei 533,5 nm) um dann bei weiterer Oxygenierung bei einem Sauerstoffpartialdruck von etwa 37 Torr in eine oxygenierte Form umzuklappen, deren Maximum bei 531,2 nm liegt.

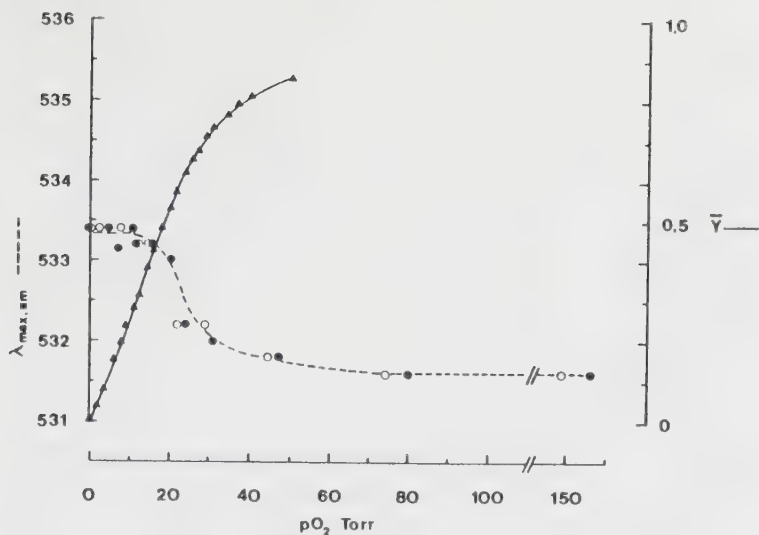


Abb. 38: Verlauf der Sauerstoffbindungskurve (▲) und des Maximums der Fluoreszenzemission (○, ●) in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck von NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,00.

Nach diesem äußerst interessanten Resultat bot es sich natürlich an, das Verhalten des markierten Hämocyanins auch bei anderen pH-Werten zu untersuchen. Als diese zu untersuchenden pH-Werte wurden 7,00 und 8,50 ausgewählt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 38 und 39 gezeigt.

Bei den beiden pH-Werten 7,00 und 8,50 kann man keinen so ausgeprägt abgestuften Verlauf der Wellenlänge des Emissionsmaximums in Abhängigkeit von der Sauerstoffbeladung des Hämocyanins erkennen wie er bei pH 7,80 auftritt. Bei diesen Versuchen sind jeweils nur zwei verschiedene Extremzustände erkennbar. Bei pH 7,00 liegt im desoxygenierten Zustand eine Konformation mit einem Emissionsmaximum von 533,4 nm vor, die der "Zwischenkonformation" bei pH 7,80 entsprechen könnte. Das Emissionsmaximum im oxygenierten Zustand von 531,6 nm deutet auf die gleiche Konformation wie im oxygenierten Hämocyanin bei pH

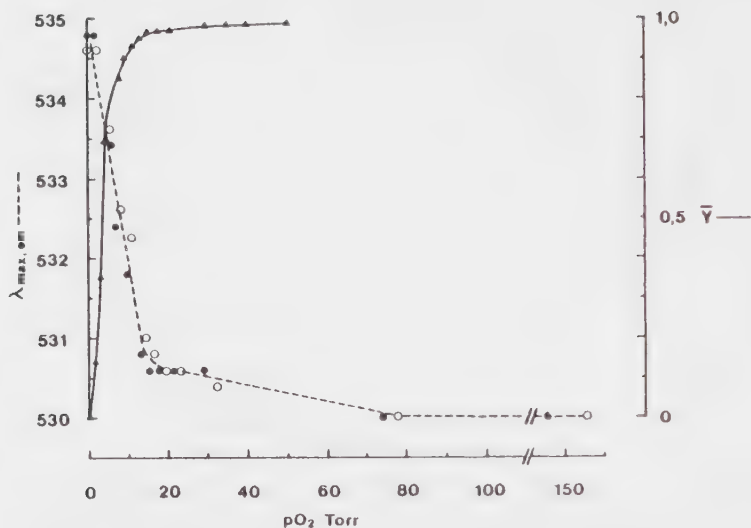


Abb. 39: Verlauf der Sauerstoffbindungskurve (▲) und des Maximums der Fluoreszenzemission (O, ●) in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck von NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,50.

7,80 hin. Bei pH 8,50 liegt dagegen im desoxygenierten Hämocyanin ein Konformationszustand mit einem Maximum bei 534,8 nm vor, der dem Zustand im desoxygenierten Hämocyanin bei pH 7,80 entspricht. Dieser Zustand geht bereits bei relativ niedrigen Sauerstoffpartialdrücken (15 Torr) in einen zweiten Konformationszustand über, der durch ein Maximum bei 530,0 nm gekennzeichnet ist. Hämocyanin bei pH 7,00 kann also den "Endzustand" (bezogen auf pH 7,80) nicht erreichen, während der "Zwischenzustand" (der für Hämocyanin bei pH 7,00 gleichzeitig desoxygenierter Endzustand ist) für Hämocyanin bei pH 8,50 übersprungen wird; nur zwei verschiedene Konformationszustände konnten nachgewiesen werden.

Als nächstes wurden NBD-chlorid-markierte Hämocyaninproben bei noch extremen pH-Werten (6,50; 9,00) sowie zwei weiteren Zwischenwerten (7,50; 8,20) auf ihre Fluoreszenzemissionsmaxima bei völliger Sauerstoffbeladung und -entladung untersucht. Bei pH 9,00 wurde dem Ansatz im 0,1 M Tris/HCl-Puffer noch 5 mM Ca²⁺ und

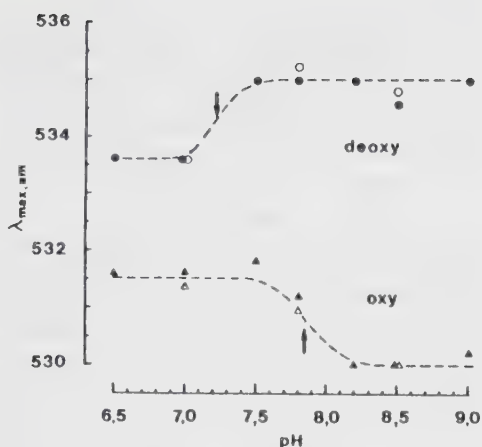


Abb. 40: Verlauf des Fluoreszenzemissionsmaximums im desoxygenierten (O, ●) und oxigenierten (Δ, ▲) Zustand von NBD-chlorid-markiertem 37S Hc. Die beiden Pfeile zeigen die Wendepunkte der Kurven an. Zu den verwendeten Puffern siehe Text. Ausgefüllte und offene Symbole stehen für zwei getrennte Versuche.

1 mM Mg^{2+} zur Stabilisierung des Hämocyanins zugesetzt. Im sauren Bereich wurde als unterer Extremwert 6,50 gewählt, da man unterhalb von pH 6 dem isoelektrischen Punkt (pH 5,0; MARKL et al., 1976) bei dem es zum Ausfallen des Proteins kommen kann, nahe kommt. Da die Pufferwirkung von Tris unterhalb pH 7 sehr stark nachläßt, wurde 0,1 M Imidazolpuffer, pH 6,50 gewählt. In Abbildung 40 sind die Wellenlängen der Emissionsmaxima für oxigeniertes und desoxygeniertes Hämocyanin gegen den pH aufgetragen; die Punkte bei pH 7,00, 7,80 und 8,50 sind den Abbildungen 37 bis 39 entnommen.

Aus Abbildung 40 geht eine eindeutige pH-Abhängigkeit der Konformation des Hämocyanins hervor. Es gibt jeweils zwei Konformationen im oxigenierten und desoxygenierten Zustand, wobei der Übergang im desoxygenierten Zustand zwischen pH 7,0 und 7,5

und im oxigenierten Zustand zwischen pH 7,6 und 8,1 erfolgt. Der Übergang von kürzeren zu längeren Emissionswellenlängen deutet im allgemeinen auf eine stärkere Exposition des Fluoreszenzfarbstoffs gegenüber dem wässrigen Lösungsmittel hin. Diese Wellenlängenänderung sollte allerdings mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden sein, da durch die Wechselwirkung des Chromophors mit den Wassermolekülen Strahlungsenergie verloren gehen sollte. Im Falle des NBD-chlorid markierten Hämocyanins jedoch findet bei Desoxigenierung eine Wellenlangenverschiebung zu größeren Wellenlängen bei gleichzeitiger Intensitätszunahme statt. Die Intensitätsabnahme im oxigenierten Zustand ist auf Quencheffekte des Sauerstoffs zurückzuführen. Sauerstoff ist, neben einigen anderen Molekülen, dafür bekannt, daß er durch die Kollision mit dem angeregten Fluorophor unter Abgabe strahlungsloser Energie eine Abnahme der Quantenausbeute bewirkt. Deshalb wurde ein Versuch durchgeführt, um diese Vermutungen näher zu untersuchen. Ich ging dabei von der Überlegung aus, daß steigende Guanidiniumhydrochloridkonzentrationen die Proteinstruktur stufenweise zerstören würden und so das gebundene NBD-chlorid mehr und mehr dem Puffer ausgesetzt würde. Ließ man die Sauerstoffkonzentration im Ansatz gleich, so sollte ein immer längerwelliges Maximum mit immer niedrigerer Fluoreszenzintensität auftreten. Tabelle 6 zeigt, daß diese Erwartungen voll eintrafen. Man kann also davon ausgehen, daß die niedrigere Fluoreszenzintensität in NBD-chlorid markierten oxigenierten Hämocyaninproben verglichen mit denen, die keinen Sauerstoff enthalten, auf Sauerstoff als Quencher zurückzuführen sind. Der maximale Sauerstoffpartialdruck war in diesen Versuchen der Luftsauerstoffdruck. Das Verhältnis NBD-chlorid:Hämocyanin im Markierungsansatz betrug 1:1. Es wurde aus dem Pool mit markiertem Hämocyanin eine definierte Menge entnommen und mit Puffer/Gdm-HCl-Lösung versetzt, so daß die Endkonzentration an Hämocyanin 0,02 mg/ml und die Endkonzentrationen an Gdm-HCl 0, 2, 4, 6 und 8 M betrugen. Das Gdm-HCl in den Ansätzen mit 6 und 8 M Gdm-HCl löste sich bei 20°C nicht, so daß das Gdm-HCl im Puffer zuerst auf 35°C erwärmt werden mußte. Bei

der darauffolgenden vorsichtigen Abkühlung auf 20°C blieb das Gdm-HCl dann in Lösung, so daß die Ansätze mit dem Hämocyanin versetzt werden konnten. Die NBD-chlorid-Hämocyanin/Gdm-HCl-Lösungen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur belassen, bevor die Fluoreszenzspektren gemessen wurden.

Tabelle 6: NBD-chlorid markiertes Hämocyanin mit steigenden Gdm-HCl-Konzentrationen zur Denaturierung versetzt. $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$; 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80; weitere Anmerkungen zur Versuchsdurchführung im Text.

Gdm-HCl	$\lambda_{\text{max,em}}$	F.I. (rel. Einheiten)
0 M	531,0 nm	$1,46 \times 10^5$
2 M	536,0 nm	$1,25 \times 10^5$
4 M	538,0 nm	$1,16 \times 10^5$
6 M	538,2 nm	$1,15 \times 10^5$
8 M	538,0 nm	$1,16 \times 10^5$

Die Fluoreszenzintensität und das Emissionsmaximum von Hämocyanin, markiert mit NBD-chlorid, verändern sich nicht mehr, wenn das Hämocyanin sich in einer Lösung befindet, die 4 M, 6 M oder 8 M an Harnstoff ist. Das bedeutet, daß das Hämocyanin bereits in 4 M Harnstoff enthaltenden Lösungen aufgefalted wird. Der Fluoreszenzfarbstoff ist dennoch nicht vollständig dem Lösungsmittel ausgesetzt, da das Emissionsmaximum des freien Farbstoffs noch 10 nm zum Langwelligen hin verschoben ist. Die Intensität der Fluoreszenz beträgt im aufgefalteten Zustand nur noch etwa 80% des nativen Zustands.

8. Proteinchemische Untersuchungen an der Untereinheit d zur Lokalisierung der NBD-chlorid Bindungsstelle

a) Gewinnung der markierten Untereinheit d

120 mg 37S Hämocyanin wurden für 2 Stunden bei 25°C mit einem molaren Überschuß von 12:1 an NBD-chlorid versetzt. Danach wurde nicht gebundener Farbstoff über eine Sephadex G 25 s.f.-Säule (1,8 x 60 cm) abgetrennt. Das fluoreszenzmarkierte Hämocyanin wurde dann für 24 Stunden gegen 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer, pH 9,6, 10 mM an EDTA zur Dissoziation dialysiert. Über eine Gelfiltrationssäule (Ultrogel AcA 44, 2 cm x 2 m) wurden die Monomeren von den Dimeren getrennt (Abb. 41). Eine Überprüfung der vereinigten Monomerenfraktionen (24-34) und Dimerenfraktionen (12-18) zeigte, daß sich über 95% der NBD-chlorid-spezifischen Fluoreszenzintensität in der Monomerenfraktion befand.



Abb. 41: Monomeren-/Dimerentrennung von dissoziiertem, NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin über eine Ultrogel AcA 44-Säule (2 cm x 2 m). Durchflußrate 10 ml/h; 60-min-Fractionen. Elutionspuffer 0,1 M Glycin/NaOH, pH 9,6 + 10 mM EDTA.

Die vereinigten Monomerenfraktionen (24-34 aus Abb. 41) wurden dann auf eine DEAE-Sepharose Cl 6B-Säule aufgetragen. Zunächst wurde die Säule mit einem Volumen 0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 8,8, 1 M an Harnstoff und 1 mM an EDTA gespült und anschließend ein linearer KCl-Gradient (0,1 - 0,3 M) im selben Puffer angelegt. Das Trennbild ist in Abbildung 42 wiedergegeben.

Die einzelnen Fraktionen wurden wiederum auf NBD-chlorid-spezifische Fluoreszenz untersucht. Nur in den Fraktionen 32 bis 46 ließ sich diese nachweisen. Zweidimensionale Immunelektrophoresen derselben Fraktionen zeigten, daß die Untereinheit d bis zur Fraktion 40 sauber, zwischen Fraktion 41 und 46 mit den Untereinheiten a, g und f verunreinigt vorlag. Deshalb wurden die Fraktionen 32 bis 40 vereinigt. Die Gesamtausbeute an d betrug

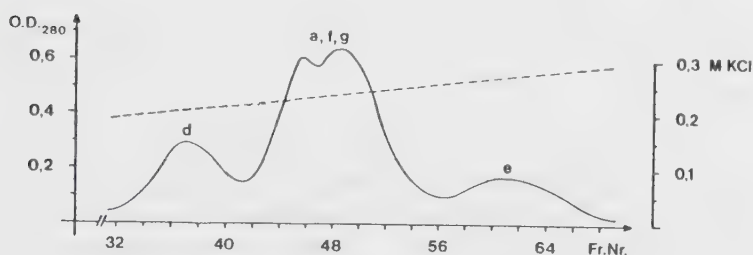
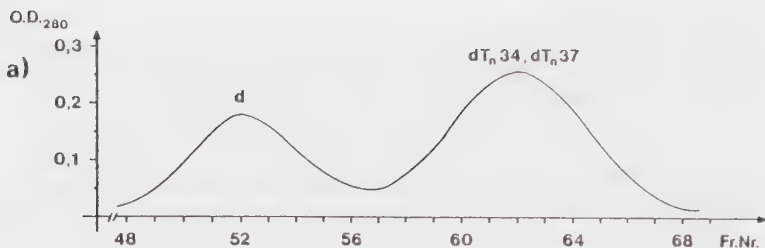


Abb. 42: Ionenaustauschchromatographie zur Auftrennung der Monomeren über eine DEAE-Sepharose Cl 6B-Säule (2,5 x 30 cm). Durchflußrate 8,6 ml/h; 60-min-Fractionen. Zur Elution wurde ein linearer KCl-Gradient (0,1 bis 0,3 M) in 0,05 M Tris/HCl-Puffer, pH 8,8 + 1 M Harnstoff + 1 mM EDTA (300 ml + 300 ml) verwendet.

12,7 mg (= 64%, berechnet nach der eingesetzten Gesamtmenge von 120 mg Hc = 20 mg d). Der Rest dürfte bei der Monomeren/Dimerentrennung sowie in den Fraktionen 41 bis 46 der Monomerentrennung verloren gegangen sein.



b)

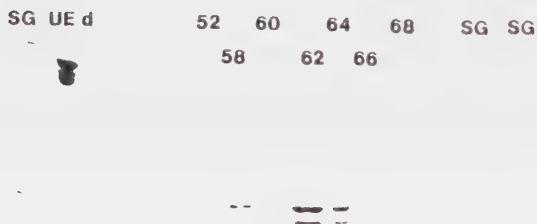
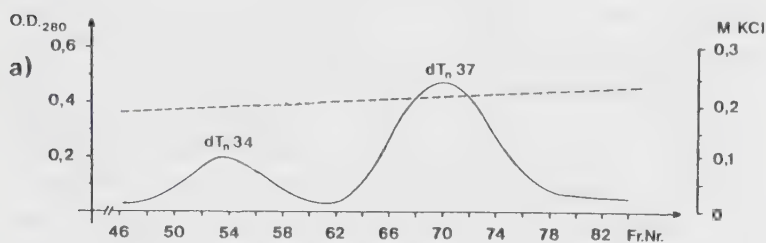


Abb. 43: a) Abtrennung der ungespaltenen UE d von den nativ-tryptischen Bruchstücken $dT_n 34$ und $dT_n 37$ über eine Sephacryl S 300 s.f.-Säule (3 x 180 cm). Durchflußrate 5 ml/h, 60-min-Fractionen. Der Elutionspuffer war 0,05 M Natriumacetat, pH 4,50 + 8 M Harnstoff. b) SDS-PAGE (10-20%) einzelner Fractionen. SG = Spaltgemisch vor der Trennung.

Die 12,7 mg Untereinheit d wurden dann über Nacht gegen 0,1 M $(NH_4)HCO_3$ -Puffer, pH 8,0 dialysiert. Am nächsten Morgen wurden für eine limitierte tryptische Spaltung 354 μ l einer Trypsinlösung (1mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 4 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von 10 μ l Eisessig wurde die Reaktion gestoppt, der Kolben für 4 Stunden bei -20°C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Friert man die Lösung nicht ein, dann beginnt sie beim Anlegen des Vacuums am Lyophilisator sehr

stark zu schäumen und es besteht die Gefahr, daß man größere Proteinmengen verliert. Das lyophilisierte Protein wurde dann in 2 ml CM-Puffer aufgenommen und 13 μ l Mercaptoethanol zugesetzt. Wie unter Material und Methoden beschrieben wurde inkubiert. 130 μ l einer Jodessigsäurelösung (2,25 mg /ml in 0,1 M NaOH) wurden zugegeben und nochmals im Dunkeln inkubiert. Nach Ende der Reaktion wurde die Lösung in einem abgedunkelten Erlenmeyerkolben gegen 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,50, 8 M an Harnstoff dialysiert.



b)

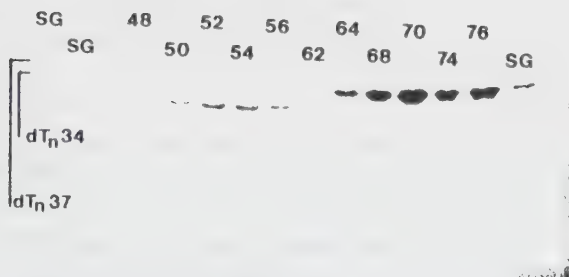


Abb. 44: a) Trennung von dT_n 34 und dT_n 37 über eine CM-Sepharose Cl 6B-Säule (0,5 x 25 cm). 0,1 M – 0,3 M linearer KCl-Gradient in 0,05 M Natriumacetat-Puffer, pH 4,50 + 8 M Harnstoff; Durchflußgeschwindigkeit 2 ml/h, 30-min-Fractionen. b) SDS-PAGE (10–20%) einzelner Fractionen. SG = Spaltgemisch vor der Trennung.

Da man nicht davon ausgehen konnte, daß die Spaltung vollständig war, wurde zur Abtrennung ungespaltener Untereinheit d eine Gelfiltration über Sephacryl S 300 s.f. durchgeführt; Abbildung 43 zeigt das Ergebnis.

Die Spaltung brachte wie man sieht weitere Materialverluste mit sich, da nur etwa 60% der Untereinheit d gespalten worden war (die Proteinmenge im Bruchstückgipfel betrug noch 7,8 mg).

Die Fraktionen 60 bis 72 (dT_n 34 und dT_n 37, siehe Abb. 43) wurden vereinigt und zur Trennung über den Ionenaustauscher CM-Sepharose Cl 6B auf eine Säule aufgetragen (Abb. 44).

Theoretisch müßten die Mengen an dT_n 34 und dT_n 37 gleich sein. Betrachtet man jedoch Abbildung 44, so sieht man daß die Menge an dT_n 34 höchstens ein Drittel der Menge an dT_n 37 ausmacht. Dies beruht auf einer irreversiblen Bindung des Spaltstücks dT_n 34 an die Matrix des Ionenaustauschers (RELSINGER, 1985). Die NBD-chlorid-spezifische Fluoreszenz befand sich jedoch ausschließlich in den Fraktionen 63 bis 75 (dT_n 37), so daß dieser Verlust für meine weiteren Versuche nicht ins Gewicht fiel. Die Ausbeute an dT_n 37 betrug 3,1 mg.

Die vereinigten Fraktionen 65 bis 75 wurden dann gegen 0,1 M $(NH_4)HCO_3$ -Puffer, pH 7,8, mit 2 mM EDTA dialysiert. Dabei fiel das Protein aus, so daß es erneut gegen den ursprünglichen Puffer, 0,05 M Natriumacetat, pH 4,50, 8 M an Harnstoff dialysiert wurde. Hierbei löste sich das Protein wieder. Beim zweiten Versuch, das tryptische Spaltstück umzudialysieren, wurde deshalb der Harnstoff schrittweise entzogen. Der Dialysepuffer war 0,1 M $(NH_4)HCO_3$, pH 7,80, der zunächst 6 M an Harnstoff war. Nach 12 Stunden wurde er gegen einen Puffer ausgetauscht, der nur noch 4 M Harnstoff enthielt. Nach weiteren 12 Stunden wurde er durch einen 2 M Harnstoff enthaltenden Puffer ersetzt. In den letzten beiden Schritten wurde zunächst Puffer verwendet der noch 1 M an Harnstoff war, schließlich wurde gegen harnstofffreien Puffer dialysiert. Aufgrund dieses schonenden Harnstoffentzugs blieb das Protein in Lösung und konnte weiter mit der V 8 Protease aus *Staphylococcus aureus* (Spaltspezifität nach Glutaminsäureresten)

gespalten werden. Dazu wurden in bidest. Wasser 5 mg/ml Protease gelöst und 12 μ l in die dT_n 37 enthaltende Lösung gegeben. Es wurde nun für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die Reaktion danach durch Zugabe von 2 ml Eisessig gestoppt. Anschließend wurde die Lösung für 4 Stunden bei -20°C eingefroren und dann lyophilisiert.

Zur Auftrennung über die HPLC wurde das Peptidgemisch in 300 μ l 0,1%-iger TFA + 100 μ l Ameisensäure gelöst. Für eine Trennung wurden 100 μ l des gelösten Gemisches auf die HPLC-Säule aufgetragen. Durch technisches Versagen (Ausfall einer Pumpe) ging während eines Trennungsganges die gesamte aufgetragene Menge verloren, so daß die Ausbeute bereits dadurch um 25% reduziert wurde. Die identischen Trennbilder der übrigen drei Läufe sind in Abbildung 45 dargestellt.

Die entsprechenden Fraktionen der drei HPLC-Trennungen wurden vereinigt und anschließend auf NBD-chlorid-spezifische Fluoreszenz untersucht. Dabei wurden zwei fluoreszierende Gipfel gefunden, in den Fraktionen 7 und 23. Beide enthielten genügend Material für eine manuelle Sequenzierung. Von beiden Peptiden wurden jeweils 6 Abbauschritte mit dem DABITC-Reagens nach CHANG et al. (1978) durchgeführt. Die gefundenen Sequenzen lauteten (die Numerierung der Sequenz erfolgte nach LINZEN et al., 1985):

469

Fr. 7: - His - Leu - Asp - His - Glu - Pro -

520

*

Fr. 23: - Leu - Asp - Lys - Phe - His - Arg -

In Peptid 7 ist keine Möglichkeit der Bindung von NBD-Chlorid an ϵ -Aminogruppen von Lysinresten gegeben. Der nächste Lysinrest befindet sich an Position 500 der Untereinheit d, die nächste potentielle Spaltstelle aber schon zwischen Glu (478) und Ile (479). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Fluoreszenz in Fraktion 7 war, daß ein kleineres fluoreszierendes Stück aus

Fraktion 23 parallel zum Bruchstück in Fraktion 7 eluiert worden war. Dagegen sprach allerdings, daß auf den DABITC-Plättchen keine

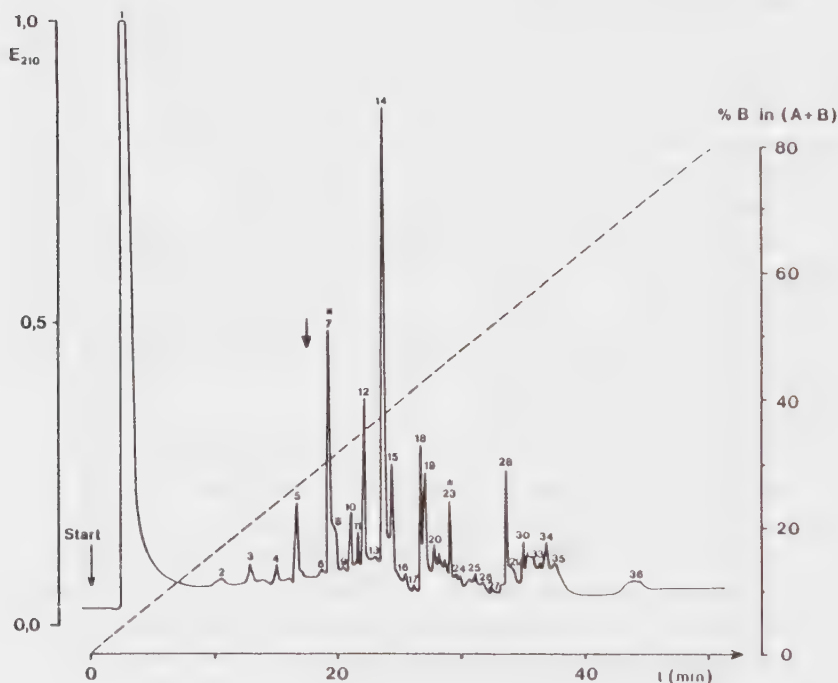


Abb. 45: HPLC-Lauf der Bruchstücke des Peptids $\text{dF}_n 37$ nach der Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V 8 Protease. Säule: C_{18} RP Vydac (0,46 x 25 cm); Lösungsmittel A: 0,1% (v/v) TFA in bidest. H_2O , Lösungsmittel B: 80% Acetonitril in Lösungsmittel A. Linearer Gradient über 50 min von 100% A bis 80% B in (A+B). Durchflußrate 2 ml/min, die einzelnen Fraktionen wurden von Hand gesammelt. Durch einen Stern gekennzeichnet sind die beiden fluoreszierenden Fraktionen (7, 23). Freies NBD-chlorid (10^{-5} M) in drei Teilen 0,1% TFA und einem Teil Ameisensäure gelöst wurde in einem weiteren Trennungsversuch an der Stelle des eingezeichneten Pfeiles eluiert. Weitere Erklärungen im Text.

Nebensequenz sichtbar war. Eine weitere Möglichkeit bestand darin, daß ein Teil des gebundenen NBD-chlorids abgespalten worden war und nun als freies NBD-chlorid eluiert wurde. Um dies zu untersuchen, wurde ein weiterer Trennungsgang auf der HPLC, nur mit gelöstem NBD-chlorid, unternommen. Während Fraktion Nr. 7 der Peptidtrennung nach 19 Minuten von der Säule kam, wurde das freie NBD-chlorid nach 17 Minuten eluiert. Diese Verschiebung ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die Säule nicht thermostatisiert war. Die Peptidisolierungen wurden bei etwa 20°C Raumtemperatur durchgeführt, während bei der Trennung mit dem Fluoreszenzfarbstoff die Temperatur bei 31°C lag. Eine Temperaturerhöhung aber führt zu einer vergleichsweise schnelleren Elution bei sonst gleichen Parametern (Laufzeit, Gradient). Damit dürfte das Auftreten der Fluoreszenz in Fraktion 7 auf freies NBD-chlorid zurückgehen. Im Peptid 23 dagegen liegt an Position 522 ein Lysinrest vor, der mit ziemlicher Sicherheit fluoreszenzmarkiert ist. Zwar ist es aufgrund der geringen vorliegenden Mengen nicht mehr möglich, die abgespaltene Aminosäure direkt auf NBD-chloridspezifische Fluoreszenz im Fluorometer zu untersuchen, aber das veränderte Laufverhalten des Lysinrests auf dem DABITC-Plättchen deutet auf eine Bindung des fluoreszierenden Stoffs an dieser Stelle hin. In Abbildung 46a ist ein Standardchromatogramm mit allen in Proteinen vorkommenden Aminosäuren dargestellt. Abbildung 46b zeigt das entsprechende Chromatogramm des dritten Abbauschrittes der Fraktion 23 aus der HPLC-Trennung. Dabei tritt nur der violette Fleck mit der Bezeichnung K_1 (α -DABTH- ϵ -DABTC-Lysin) auf, wie er von normalen Lysinresten herrührt. K_2 und K_3 fehlen, dagegen tritt ein weiterer orangeroter Fleck auf, den ich mit K_N bezeichnet habe. Dabei muß es sich um α -DABTH- ϵ -NBD-chlorid-Lysin handeln. Das Auftreten des Flecks K_1 erklärt das Vorhandensein freien Fluoreszenzfarbstoffs. Die freie ϵ -Aminogruppe konnte nach der Ablösung des Chromophors wieder mit dem DABITC-Reagenz zu ϵ -DABTC-Lysin umgesetzt werden.

Das Arginin an Position 525 war nur noch sehr schwach nachweisbar, so daß man davon ausgehen kann, daß das Peptid bald

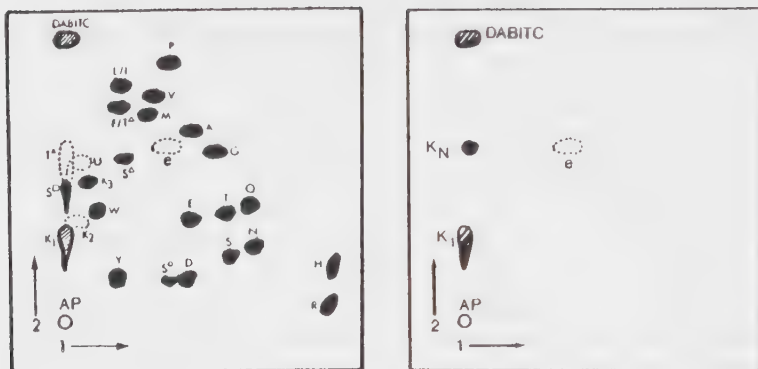


Abb. 46: a) Vergrößerte Darstellung der zweidimensionalen Dünnschicht-Chromatographie auf Polyamidfolien von DABTH-Standard-Aminosäuren; Originalgröße der Blättchen 2,5 x 2,5 cm; nach CHANG et al. (1978). b) Darstellung der Produkte des 3. Abbauschrittes des Gipfels Nr. 23 des HPLC-Laufes (Abb. 45) im gleichen Vergrößernungsmaßstab wie unter a.

K_1 = α -DABTH- ϵ -DABTC-Lysin, K_2 = α -PTH- ϵ -DABTC-Lysin, K_3 = α -DABTH- ϵ -PTC-Lysin, K_N = α -DABTH- ϵ -NBD-chlorid-Lysin, e = DABTC-Diethylamin (Marker). Die übrigen Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben, AP bezeichnet den Aufragspunkt. Ausgefüllte Flecken erscheinen rot, punktierte Flecken blau und schraffierte Flecken violett. 1 = 1. Dimension, Laufmittel Eisessig/Wasser 1:2 (v/v), 2 = 2. Dimension, Laufmittel Toluol/n-Hexan/Wasser 2:1:1 (v/v/v).

abbrach. Tatsächlich liegt an Position 528 mit Glutaminsäure wieder eine Spaltstelle für die Staphylococcus aureus-Protease vor.

GAYKEMA et al. (1984) haben über die Röntgenstrukturanalyse mit hoher Auflösung (3,2 Å) die Raumstruktur des Panulirus interruptus Hämocyanins bestimmt. Man nimmt an, daß neben einer großen

Homologie in der Primärstruktur auch die Tertiärstruktur zum Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* homolog ist. Betrachtet man die stereoskopischen Abbildungen bei GAYKEMA et al., so sieht man, daß die Position 522 an der Oberfläche der dritten Dömane liegt. In beiden Arten kommt an dieser Stelle ein Lysinrest vor. Die leichte Markierbarkeit des Lysin (522) läßt sich gut mit seiner exponierten Lage im Molekül vereinbaren. Inwieweit dieser Abschnitt bei Oxigenierungs- bzw. Desoxigenierungsvorgängen seine Lage innerhalb des Moleküls verändert, soll neben anderem in der Diskussion erörtert werden.

DISKUSSION

In diesem Abschnitt sollen im wesentlichen zwei Punkte behandelt werden: Zum einen sollen die verschiedenen Aspekte der Bindung des NBD-chlorids an die Untereinheit d im Hinblick auf die beobachtete Wellenlängenverschiebung des Emissionsmaximums in Abhängigkeit von der Oxigenierung diskutiert und mit ähnlichen Effekten in anderen Proteinen verglichen werden und zum anderen sollen die gefundenen funktionellen Daten auf ihre Übereinstimmung mit verschiedenen Modellvorstellungen über allosterische Proteine getestet werden.

I. Zur Bindung des NBD-chlorids am Hämocyanin

Proteine können aufgrund ihrer hochmolekularen Zusammensetzung definierte dreidimensionale Strukturen einnehmen. Dies ist für Vorgänge wie Katalyse, Erkennung von Strukturen und spezifische Bindung unabdingbare Voraussetzung. Die gebildeten Proteinstrukturen sind allerdings nicht starr, sondern in gewissem Maße flexibel. Allosterische Effekte können nur aufgrund dieser Flexibilität gedeutet werden.

Die Peptidbindung selbst hat wegen ihres partiellen Doppelbindungscharakters eine stark eingeschränkte Beweglichkeit. Eine Rotation innerhalb einer Peptidkette ist deshalb nur zwischen den C_{α} -Atomen und den benachbarten Bindungen möglich. Trotz der großen Beweglichkeit von zwei Dritteln der Bindungen im "Rückgrat" des Proteins findet man in Proteinen nur relativ selten Bereiche, in denen die Kette in einer zufälligen Struktur ("random coil") vorliegt. PAULING und COREY (1951a,b,c) konnten erstmals den Nachweis geordneter Elemente auf der Ebene der später so genannten Sekundärstruktur (α -Helix, paralleles und antiparalleles β -Faltblatt) erbringen.

LAKOWICZ und WEBER (1973a,b) zeigten dann mit Sauerstoff- und Iodidquenchversuchen an Tryptophanresten in Proteinen, daß diese Proteine "atmen", das heißt daß periodische Schwingungen innerhalb

eines Moleküls auftreten. Dabei werden dem Sauerstoff aufgrund seiner geringeren Größe gegenüber dem Iodidion immer wieder Kanäle ins Innere eines globulären Proteins eröffnet, die dem Iodid verschlossen bleiben. Die Quencheffektivität des Sauerstoffs ist somit in Proteinen 10 bis 20 mal größer als die des Iodids. An freiem Tryptophan zum Beispiel sind beide Quenchsubstanzen gleich wirksam. Ein weiteres Ergebnis ihrer Versuche war, daß die Fluktuationsvorgänge im Molekül im Nanosekundenbereich ablaufen, also genau in der Zeitspanne, die auch für Fluoreszenzvorgänge charakteristisch ist. Daher ist die Fluoreszenzspektroskopie ein sehr wertvolles Mittel zur Bestimmung von Konformationsänderungen in Proteinen.

Man findet drei mögliche Arten der Konformationsänderungen in Proteinen.

1) Bewegungen von Aminosäureseitenketten

Zu ihrem Nachweis werden NMR-Spektren verwendet. Insbesondere kann die Bewegung von Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophanresten nachgewiesen werden (WÜTHRICH und WAGNER, 1978).

MUNRO et al. (1979) verwendeten die Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie, um an verschiedenen Proteinen die Flexibilität von Tryptophanresten nachzuweisen. Diese Flexibilität ist nicht in allen Proteinen gleich. Für die *Staphylococcus aureus* Nuclease B sind die Rotationszeiten für den Tryptophanrest genauso lang wie für das gesamte Molekül (10 nsec), das heißt, daß die Seitenkette des Tryptophans sehr starr in der Kette vorliegt. Im Gegensatz dazu ist beim basischen Myeloprotein A1 aus dem Rind die Rotationszeit zehnmal länger als der Wert für den Tryptophanrest. Dies zeigt eine enorme Beweglichkeit für den aromatischen Seitenarm des Tryptophans an.

2) Bewegung ganzer Proteinkettenabschnitte

Perutz hat über viele Jahre hinweg mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse das Desoxihämoglobin mit Oxihämoglobin (= Methämoglobin) verglichen und dabei z.B. herausgefunden, daß sich das C-terminale Ende der Helix H während der Oxygenierung von der Helix F entfernt (PERUTZ, 1978; PERUTZ in SCHULZ und SCHIRMER, 1979, S.216 f).

ARTYMIUK et al. (1979) und FRAUENFELDER et al. (1979) konnten in Lösung mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimenten zeigen, daß in Lysozym- und Methämoglobin-Molekülen sich größere Kettenabschnitte gegeneinander bewegen können. In der Einleitung wurden schon einige Beispiele genannt, in denen mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie Konformationsänderungen auf dem Niveau von Sekundärstrukturabschnitten nachgewiesen wurden.

3) Bewegung von Domänen und Untereinheiten gegeneinander

Domänen sind definiert als funktionelle oder strukturelle Abschnitte auf einer Polypeptidkette (nach SCHULZ und SCHIRMER, 1979, S.46f), Untereinheiten treten bei oligomeren Proteinen auf. Die Ursache von Bewegungen sind oft nur kleine Strukturänderungen in verbindenden Abschnitten (bei Domänen) und von Kontaktflächen (bei Untereinheiten). Am Beispiel des Immunglobulins G konnten COLMAN et al. (1976) und MARQUART et al. (1980) mit Hilfe der Röntgenkristallographie nachweisen, daß es im Bereich zwischen den schweren Ketten, die für die Antigenbindung verantwortlich sind, und den leichten Ketten eine Art von Scharnier gibt, die dem Gesamtmolekül eine große strukturelle Freiheit gibt, bei der die schweren und die leichten Ketten sich gegeneinander bewegen können. Auch zwischen den vier Domänen der schweren Ketten herrscht eine große Beweglichkeit, so daß das Antikörper-Molekül für eine flexible Anpassung an das Antigen-Molekül bestens gerüstet ist. Der Nachweis dieser Konformationsänderungen von Domänen und Untereinheiten zueinander ist aber nur mit röntgenstrukturanalytischen Methoden oder mit Hilfe von Fluoreszenzsonden möglich, die sich zwischen zwei Domänen oder Untereinheiten befinden.

Um entscheiden zu können, auf welcher Ebene die Konformationsänderungen im NBD-chlorid-markierten 37S Hämocyanin auftraten, war es wichtig zu wissen, an welcher Stelle des Moleküls der Fluoreszenzfarbstoff gebunden hat. Im Markierungsansatz 1:0,5 (Hämocyanin : NBD-chlorid) ist eine selektive Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die Untereinheit d möglich. Der Bindungsort des NBD-chlorids wurde mit dem Lysinrest 522 eindeutig geklärt.

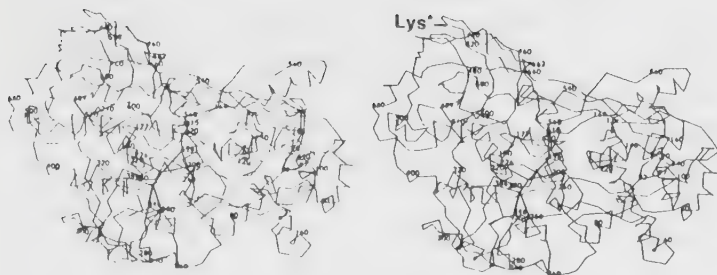


Abb. 47: Stereoskopisches Bild des Rückgrats einer Untereinheit des *Panulirus interruptus* Hämocyanins. Man kann sehr gut die oberflächennahe Lage des NBD-chlorid-markierten Lysinrestes (*) erkennen. Die Abbildung wurde dem Artikel von GAYKEMA et al. (1984) entnommen.

In Abb. 47 ist das Kettenrückgrat des *Panulirus interruptus*-Hämocyanins angegeben. An Hand dieser Abbildung und weiteren Stereoabbildungen in der Veröffentlichung von GAYKEMA et al. (1984) sieht man, daß sich der fluoreszenzmarkierte Lysinrest 522 an der Oberfläche des Proteins mit Kontakt zum Lösungsmittel befindet. Bei meinen Versuchen mit NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin trat eine Verschiebung des Emissionsmaximums um etwa 4 nm ($\pm 0,2$ nm, von 531 nm auf 535 nm) bei Oxygenierung bzw. Desoxygenierung auf. Da andererseits eine Denaturierung des Hämocyanins mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid nur eine weitere Verschiebung um 3 nm (auf 538 nm) bewirkte, kann man davon ausgehen, daß der markierte Lysinrest 522 eine größere Bewegung innerhalb des Moleküls ausgeführt haben muß. Im oxygenierten Zustand interagiert das gebundene NBD-chlorid mit anderen Aminosäureresten nichtkovalent und ist so dem wässrigen Milieu weitgehend entzogen (charakterisiert durch die kürzere Emissionswellenlänge). Im desoxygenierten Zustand dagegen muß man

eine stärkere Exponierung des Abschnitts, an dem der Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, gegenüber den umgebenden Wassermolekülen annehmen. Durch die Wechselwirkung mit Lösungsmittelmolekülen geht Strahlungsenergie verloren, was durch ein längerwelliges Emissionsmaximum zum Ausdruck kommt. Das Maximum und die Fluoreszenzintensität sind sehr empfindlich gegenüber der Polarität des umgebenden Mediums (Review siehe BRAND und GOHLKE, 1972).

euryd.pep

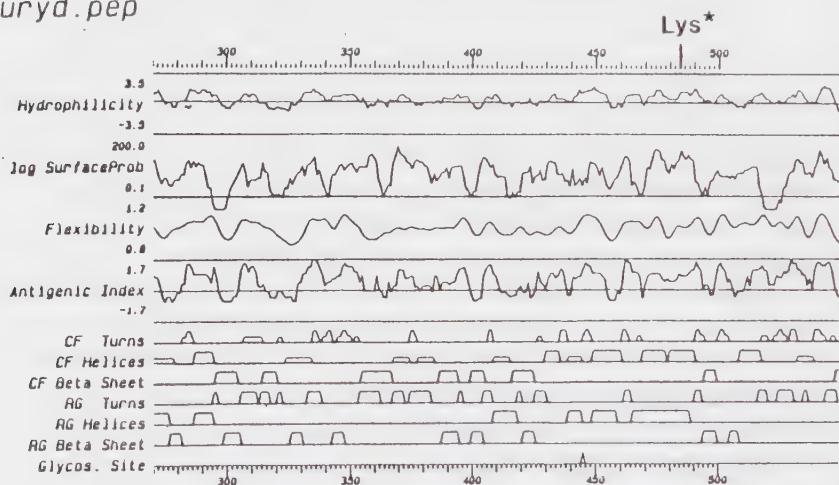
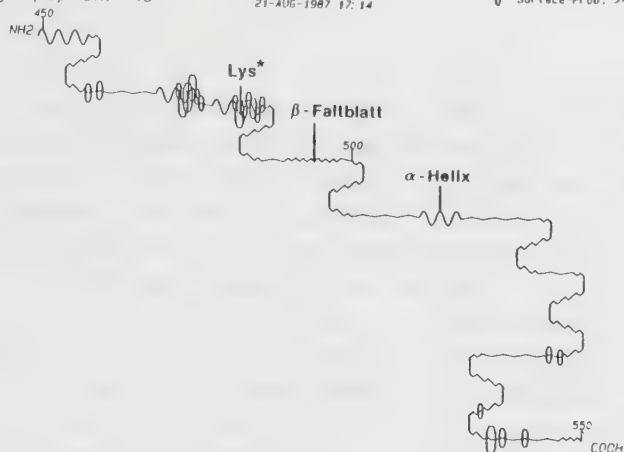


Abb. 48: Verschiedene Parameter (Hydrophilizität, Flexibilität, Fähigkeit als Antigen zu wirken) und Voraussagen zur möglichen Sekundärstruktur nach CHOU-FASMAN (1978, CF) und GARNIER et al. (1985, RG) an der Untereinheit d. Die Simulation wurde am Pettenkofer-Institut der Universität München von S. Modrow durchgeführt. Der Abschnitt umfaßt etwa 280 Aminosäurereste der Untereinheit d des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Der fluoreszenz-markierte Lysinrest ist gekennzeichnet (*). Die Numerierung der Aminosäurereste auf der Abbildung ist durchgehend (ohne Lücken zur Homologisierung).

euryd.pep ck: 40

Chou-Fasman prediction
21-AUG-1987 17: 14

0 Surface-Prob. >= 7.0



euryd.pep ck: 40

Robson-Garnier prediction
21-AUG-1987 17: 14

0 Surface-Prob. >= 7.0

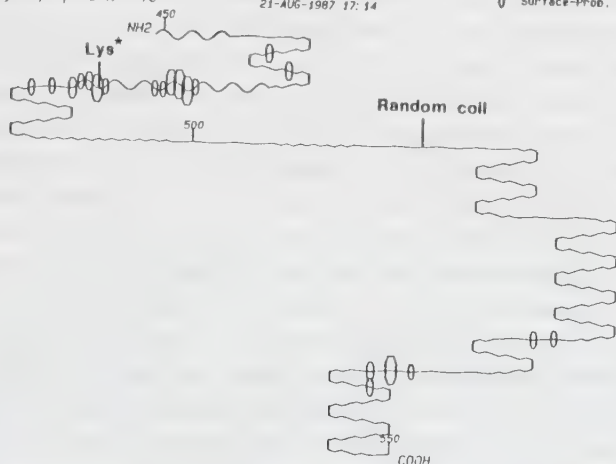


Abb. 49: Berechnung der Oberflächenwahrscheinlichkeit bestimmter Aminosäurereste nach CHOU-FASMAN (1978) und ROBSON-GARNIER (1985) der Untereinheit d des Hämocyanins aus *Eurypelma californicum*. Der markierte Lysinrest ist gekennzeichnet (*). Die sechseckigen Symbole stehen für die Oberflächenwahrscheinlichkeit bestimmter Aminosäurereste. Je größer das Symbol, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit eines Restes an der Oberfläche zu liegen. Bereiche ohne Symbol liegen im Inneren des Proteins.

Nach LINZEN et al. (1985) befindet sich im *Panulirus interruptus* Hämocyanin zwischen Rest 518 und 528 eine β -Faltblattstruktur (3G; 3 bedeutet in der dritten Domäne, G in der siebten β -Faltblattstruktur dieser Domäne). Berechnungen von Sekundärstrukturanteilen im *Eurypelma californicum* Hämocyanin nach Chou-Fasman (Abb. 48) deuten aber eher auf eine helicale Sekundärstruktur in diesem Abschnitt hin. Bezüglich der Hydrophilizität verhält sich der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 514 und 524 neutral, so daß ein wechselseitiges Vorliegen dieses Abschnitts in hydrophiler und hydrophober Umgebung nicht unwahrscheinlich wäre. Die Flexibilität in diesem Abschnitt ist relativ groß und auch der Antigen-Index ist hoch. Auch die Wahrscheinlichkeit, daß dieser Abschnitt an der Oberfläche liegt, ist nach den Voraussagen von CHOU-FASMAN (1978) und GARNIER et al. (1985) sehr groß (Abb. 49). Vergleicht man die Oberflächenwahrscheinlichkeit der Untereinheit d mit der von e, so findet man bei der Untereinheit d in dem fluoreszenzmarkierten Abschnitt eine etwa zehnmal höhere Oberflächenwahrscheinlichkeit als bei der Untereinheit e (nach EMINI et al., 1985). Dies ist ein Grund für die Möglichkeit der selektiven Markierung der Untereinheit d bei niedrigen eingesetzten Fluorophormengen.

Nach anderen Autoren, die auch die Wahrscheinlichkeit vom Auftreten bestimmter Sekundärstrukturanteile nach der Aminosäuresequenz vorherzusagen versuchten, würden sich in dem Abschnitt zwischen Rest 518 und 528 eher α -Helixbildner als β -Faltblattbildner finden (siehe SCHULZ und SCHIRMER, 1979, S.109 ff). Allerdings hat es sich im Laufe der Jahre herausgestellt, daß die Güte dieser Sekundärstrukturvoraussagen nur wenig über 50% liegt (Verhältnis korrekt : falsch; nach HUBER und BENNETT, 1982). Ein Grund für die Schwierigkeit dieser Voraussagen liegt sicherlich darin, daß man immer nur begrenzte Bereiche untersuchen kann, wobei der Einfluß weiter entfernt liegender Proteinabschnitte nicht berücksichtigt werden kann. Auch wenn sich geringe Differenzen in der Sekundärstruktur zwischen dem Hämocyanin von *Panulirus interruptus* und *Eurypelma californicum* ergeben würden, kann davon ausgegangen wer-

den, daß sich der generelle Verlauf der Polypeptidkette nur wenig unterscheidet, da sehr viele Glycin- und Prolinreste in den Aminosäuresequenzen verschiedener Arten und Untereinheiten konservativ angeordnet sind. Glycin (sehr große Beweglichkeit) und Prolin (keine Drehbarkeit) aber sind die Aminosäuren, die zum größten Teil für Richtungsänderungen in Proteinketten verantwortlich sind.

Zur Änderung der Sekundärstruktur bei Oxigenierung und Desoxigenierung führte REISINGER (1985) ausführliche Circular dichroismusstudien am 37S Hämocyanin und an isolierten Untereinheiten durch. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, Sekundärstrukturanteile (α -Helix, β -Faltblatt) in einem Protein zu bestimmen. Allerdings beinhalten absolute Voraussagen zum α -Helix- bzw. β -Faltblattgehalt eines Proteins große Unsicherheiten, da die direkt gemessenen Elliptizitätswerte noch mit empirisch bestimmten Korrekturfaktoren multipliziert werden müssen. Ich werde hier also nicht absolute Werte bezüglich des α -Helixgehalts, sondern besser die Elliptizitätswerte einzelner Untereinheiten vergleichen. Dabei findet man, daß der Elliptizitätswert bei 220 nm (der Rückschlüsse auf den α -Helixgehalt zuläßt) sich zwischen oxigeniertem und desoxigeniertem Zustand bei jeder Untereinheit (a-f) in unterschiedlichem Maße ändert. Untereinheit e bleibt praktisch strukturell unverändert (oxi/deoxi $-6600 \text{ grad} \times \text{cm}^2/\text{dezimol}$), während bei der Untereinheit d die Elliptizität zwischen -6400 (oxi) und -4500 (deoxi, jeweils $\text{grad} \times \text{cm}^2/\text{dezimol}$) schwankt. Die Änderung der Elliptizität im Gesamtmolekül entspricht der Elliptizitätsänderung der Summe der Untereinheiten, so daß man davon ausgehen kann, daß die isolierten Untereinheiten ähnliche Konformationsänderungen wie im nativen Molekülverband ausführen. Die Tatsache, daß die Untereinheit d die stärksten Änderungen der Struktur in Abhängigkeit vom Oxigenierungsgrad zeigt, läßt sich sehr gut mit den von mir beobachteten Konformationsänderungen an dieser Untereinheit in Einklang bringen.

II. Vergleich der gewonnenen funktionellen Daten mit gängigen Modellen zur allosterischen Wechselwirkung von Proteinen

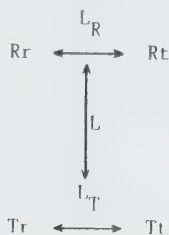
Wie im vorhergehenden Abschnitt deutlich wurde, sind Proteine flexible Gebilde. Bestimmte Strukturen sind aber energetisch günstiger als andere, und die Stabilität kann von Liganden und Substraten beeinflusst werden. Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben ist die Röntgenstrukturanalyse das sicherste Mittel, Konformationen nachzuweisen. Eine der vielen Schwierigkeiten dieser Methode liegt jedoch darin, Kristalle bestimmter Konformation zu züchten.

Eine zweite Methode, Konformationsänderungen nachzuweisen ist die Fluoreszenzspektroskopie. Im Falle des Hamocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum* ist es mir gelungen, mit NBD-chlorid, das an die Position 522 der Untereinheit d bindet, eine Fluoreszenzsonde zu placieren, die auf Änderungen der Konformation reagiert. Im nächsten Abschnitt soll untersucht werden, inwieweit diese beobachteten Änderungen mit gängigen Modellen über kooperative Proteine in Einklang zu bringen sind.

Im wesentlichen unterscheidet man dabei zwischen zwei Modellen, die von unterschiedlichen Voraussetzungen ausgehen. Im MWC-Modell (MONOD et al., 1965) - auch Symmetrie-Modell genannt - liegt das Makromolekül in Abwesenheit des Liganden in mindestens zwei verschiedenen Konformationen (R,T) vor, die unterschiedliche Affinität zum Liganden (K_R , K_T) haben. Die mittlere Verweildauer des Liganden am Protein hängt aber von der Affinität ab. Dadurch wird das unbeladene Molekül mit der hohen Affinität aus dem Gleichgewicht entnommen und aus dem Pool mit der niedrigeren Affinität nachgebildet. Durch die Bindung des Liganden wird keine Konformationsänderung bewirkt. Im Gegensatz dazu wird beim KNF-Modell (KOSHLAND et al., 1966) - auch Sequenz-Modell genannt - durch die Ligandenbindung eine neue Konformation induziert. Im KNF-Modell sind hybride Konformationszustände erlaubt, während im MWC-Modell zumindest in seiner ursprünglichen Form diese Hybride nicht auftreten dürfen.

Größere Makromoleküle zeichnen sich durch Hierarchien in der Quartärstruktur aus. Im Nesting-Modell, dessen grundsätzliche Idee von WYMAN (1972, 1984) allgemein formuliert wurde, wurden den Hierarchien in der Struktur Hierarchien allosterischer Wechselwirkungen zugeordnet (ROBERT et al., 1987). Die Art der allosterischen Wechselwirkungen kann sowohl auf dem MWC- als auch auf dem KNF-Modell basieren. Durch die Interaktion der Unterstrukturen gewinnt das Gesamtmolekül möglicherweise neue Qualitäten, wie zum Beispiel beim Hämoglobin, wo das $\alpha\beta$ -Dimer selbst nicht kooperativ ist. Erst die Wechselwirkung zweier $\alpha\beta$ -Dimere bedingt durch die Assoziation zum Tetramer gibt dem Hämoglobin die Möglichkeit zur kooperativen Bindung von Sauerstoff (HEWITT et al., 1972; ACKERS et al., 1976; MILLS et al., 1976; CHU et al., 1984; JOHNSON et al., 1984).

Die kleinste sich wiederholende, strukturell identische Einheit im 37S Hämocyanin aus *Eurypelma californicum* ist das 12-mer. Es dimerisiert isolog zum 24-meren Gesamtmolekül (DECKER et al., 1980; MARKL et al., 1981, 1982). Das Bindungsverhalten von Sauerstoff und Kohlenmonoxid durch *Eurypelma californicum* Hämocyanin konnte nur unter der Annahme des 12-mers als allosterischer "Untereinheit" zufriedenstellend analysiert werden (DECKER et al., 1986; ROBERT et al., 1987; DECKER et al., 1987, in Vorbereitung). Mittels der Konstanten, die im folgenden näher erklärt werden, können die Populationen der verschiedenen Konformationszustände in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration berechnet werden. Dazu ist es notwendig, auf die Gewinnung der für das Nesting-Modell charakteristischen Konstanten näher einzugehen. Vier mögliche Zustände werden angenommen: R_r , R_t , T_r und T_t . Sie stehen über folgende Konstanten miteinander im Gleichgewicht:



Die Affinitätskonstanten für die vier Konformationszustände (K_{Rr} , K_{Rt} , K_{Tr} und K_{Tt}) und die Gleichgewichtskonstanten (L_R , L_T und L) von NBD-chlorid-markiertem Hämocyanin wurden mit Hilfe eines Computerfits gewonnen (ATARI 1040 ST^F). Das Programm basiert auf dem "non-linear least-squared"-Algorithmus nach MARQUARDT (1963). Es wurde im Labor von S. Gill in Boulder/Colorado, USA, erstellt und von H. Decker modifiziert. In Tabelle 7 sind für die einzelnen pH-Werte die Fitkonstanten (das sind die nach dem Rechnerprogramm ermittelten Werte für L , L_R , L_T , R_r , R_t , T_r , T_t) zusammengefaßt. Die Bindungskurven, die bei pH 7,80 gewonnen wurden, konnten in keinem Fall mit dem simplen MWC-Modell beschrieben werden, was jedoch für die bei pH 7,00 und pH 8,50 gewonnenen Bindungskurven der Fall war.

Wenn man den SEP (Standard Error of Point, Standardabweichung) als ein Maß für die Güte des Fits ansieht, kann man auch für pH 7,00 und pH 8,50 das MWC-Modell ($N=6$, $N=24$) verwerfen. Lediglich unter der Annahme, daß bei pH 7,00 12 Untereinheiten ($N=12$) die allosterische "Untereinheit" bilden, bekommt man einen zufriedenstellenden Wert für die Standardabweichung der errechneten Konstanten (0,0086; für gute Fits liegt der SEP-Wert unter 0,01). Bei pH 8,50 läßt sich die Bindungskurve nicht nach dem MWC-Modell ($N=12$) zufriedenstellend beschreiben.

Beim Vergleich der für das Nesting-Modell (2×12) gewonnenen Werte sieht man, daß die Affinitäten für die vier Konformationen (K_{Rr} , K_{Rt} , K_{Tr} , K_{Tt}) für die drei untersuchten pH-Werte in der gleichen Größenordnung liegen. Eine Ausnahme bildet der T-Zustand für pH 7,00, hier scheint der Tt -Zustand nicht aufzutreten. Dies deutet auf eine Überbestimmung des Systems hin. Den besten Fit für die Sauerstoffbindungskurven bei pH 7,00 liefert das MWC-Modell ($N=12$). Der pH-Wert wirkt sich nicht auf die Affinitäten der unterschiedlichen nach dem Nesting-Modell geforderten Konformationspezies aus, wohl aber auf Verteilung dieser Spezies, wie man an Hand der allosterischen Gleichgewichtskonstanten (L_R , L_T) sehen kann.

Tabelle 7: Konstanten aus dem Fitprogramm (siehe Text) für verschiedene Modelle (MWC mit N=6, N=12 und N=24 und Nesting 2x12) und verschiedene pH-Werte. Die Anzahl der gefitteten Meßpunkte (ist gleich der Anzahl der abgegriffenen Punkte auf der Sauerstoffbindungskurve) beträgt für die Untersuchungen am MWC-Modell 20, für das Nesting-Modell 45. SEP = Standard Error of Point (Standardabweichung). Bei den Gleichgewichtskonstanten (K_R , K_T , K_{Rr} , K_{Rt} , K_{Tr} , K_{Tt}) handelt es sich um Assoziationskonstanten (Torr^{-1}). Für pH 7,80 war eine Berechnung der Konstanten nach dem MWC-Modell nicht möglich; für pH 7,00 scheinen die Berechnungen für die Gleichgewichtskonstanten nach dem Nesting-Modell (2x12) überbestimmt zu sein, da der Tt-Zustand praktisch nicht auftritt.

MWC-Modell mit N=6	pH 7,00	pH 8,50
K_R	$3,31 \pm 0,0002$	$1,81 \pm 0,036$
K_T	$0,037 \pm 0,0005$	$0,089 \pm 0,0081$
L	$1,82 \times 10^{10}$	$6,31 \times 10^4$
SEP	0,015	0,015

MWC-Modell mit N=12

K_R	$0,098 \pm 0,004$	$3,68 \pm 0,06$
K_T	$0,031 \pm 0,0011$	$0,15 \pm 0,007$
L	$1,57 \times 10^3$	$3,24 \times 10^{12}$
SEP	0,0086	0,042

MWC-Modell mit N=24

K_R	$0,086 \pm 0,0039$	$0,426 \pm 0,06$
K_T	$0,034 \pm 0,0015$	$0,133 \pm 0,02$
L	$6,31 \times 10^4$	$3,93 \times 10^5$
SEP	0,014	0,040

Fortsetzung Tabelle 7:

Nesting(2x12)	pH 7,00	pH 7,80	pH 8,50
K _{Rr}	0,110 $\pm$ 0,0003	2,264 $\pm$ 0,02	0,364 $\pm$ 0,001
K _{Rt}	0,037 $\pm$ 0,0003	0,032 $\pm$ 0,001	0,109 $\pm$ 0,0008
L _R	5,06 ($\pm$ 0,11) $\times 10^3$	5,44 ($\pm$ 0,53) $\times 10^{17}$	4,65 ($\pm$ 0,11) $\times 10^2$
K _{Tr}	1,056 $\pm$ 0,002	1,235 $\pm$ 0,253	1,412 $\pm$ 0,002
K _{Tt}	0,003 $\pm$ 0,003	0,0135 $\pm$ 0,001	0,060 $\pm$ 0,0021
L _T	2,19 ($\pm$ 0,04) $\times 10^{13}$	5,30 ($\pm$ 1,49) $\times 10^{14}$	4,74 ($\pm$ 0,08) $\times 10^6$
L	3,00 $\pm$ 0,11	119 $\pm$ 22,5	6,7 $\pm$ 0,24
SEP	0,0047	0,0032	0,0054

Als nächstes möchte ich die Abhängigkeit der maximalen Emissionswellenlänge vom Oxygenierungszustand bei verschiedenen pH-Werten untersuchen. Abbildung 40 läßt auf insgesamt vier unterschiedliche Konformationen, je zwei im oxigenierten Zustand (zwischen pH 6,5 und 7,5 charakterisiert durch ein Maximum bei 531,5 nm und zwischen pH 8,0 und 9,0 durch ein Maximum bei 530 nm) und im desoxigenierten Zustand (zwischen pH 6,5 und 7,0 charakterisiert durch ein Maximum bei 533,5 nm und zwischen pH 7,5 und 9,0 durch ein Maximum bei 535 nm) schließen. Während bei pH 7,00 (Abb. 37) und pH 8,50 (Abb. 39) die Übergänge von einem in den anderen Zustand direkt erfolgen, tritt bei pH 7,80 (Abb. 38) eine Zwischenstufe auf, deren charakteristische maximale Wellenlänge von 533,5 nm die Vermutung nahelegt, daß es sich hierbei um die Konformation handelt, die bei pH 7,00 im desoxigenierten Zustand vorliegt. Insgesamt lassen sich von den vier möglichen nachweisbaren Konformationszuständen in NBD-chlorid markiertem Hämocyanin bei pH 7,80 drei (Emissionsmaxima von 531,5 nm, 533,5 nm und 535 nm), bei pH 7,00 (Maxima von 531,5 nm und 533,5 nm) und bei pH 8,50 (Maxima bei 530 und 535 nm) je zwei Zustände nachweisen. Die gemessenen intermediären Emissionsmaxima außerhalb der Plateaus bei

allen untersuchten pH-Werten dürften auf unterschiedliche Anteile der verschiedenen, in der Lösung vorliegenden Konformationsspezies zurückzuführen sein. Wenn man jeder gemessenen Wellenlänge außerhalb der Plateaus eine Spezies zuordnen wollte, dann müßte man fordern, daß sich alle Hämocyaninmoleküle bei einem bestimmten Sauerstoffpartialdruck im selben Beladungszustand befinden. Diese Voraussetzung ist aber sicher nicht gegeben. Anders verhält es sich mit dem stabilen Zwischenzustand bei pH 7,80 (angezeigt durch das Plateau bei 533,5 nm). Dieser ist über einen Bereich von etwa 10 Torr nachweisbar. Nach dem Nesting-Modell muß es sich hierbei um den Ausdruck für einen echten Konformationszustand handeln (Rt).

Bei den Konformationszuständen, die durch kurzwellige Maxima charakterisiert sind, steht die Wechselwirkung zwischen Fluoreszenzreagenz und Protein im Vordergrund, während bei den Zuständen mit langwelligen Maxima die Wechselwirkung zwischen Chromophor und Lösungsmittel (Wasser) dominiert. Für pH 7,80 gibt es noch den zusätzlichen Zustand, bei dem sowohl die Wechselwirkungen zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Protein als auch die zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Lösungsmittel hervortreten. Da der Sauerstoffquencheffekt keine signifikante pH-Abhängigkeit zeigt, kann man sicher sein, daß dieser Effekt bei allen drei untersuchten pH-Werten gleichartige Verschiebungen in der Fluoreszenzintensität zur Folge hat und daß damit keine artifiziellen Verschiebungen des Emissionsmaximums einhergehen. Ein weiterer möglicher Einwand zur Signifikanz der gemessenen Wellenlängenverschiebung beruht auf der möglichen Störung der Messung durch intrinsische Chromophore. Die fluoreszierenden proteinogenen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin werden aber alle im UV-Bereich angeregt und emittieren auch dort, so daß eine Beeinträchtigung der Messung aus dieser Richtung ausgeschlossen werden kann.

Es stellte sich nun die Frage, ob die vorausgesagten Spezies, die nach den Berechnungen des Fitprogramms auftreten sollen, den beobachteten Konformationsänderungen gegenübergestellt werden können. Auf der Basis $N=12$ des MWC-Modells ist nur für pH 7,00 eine

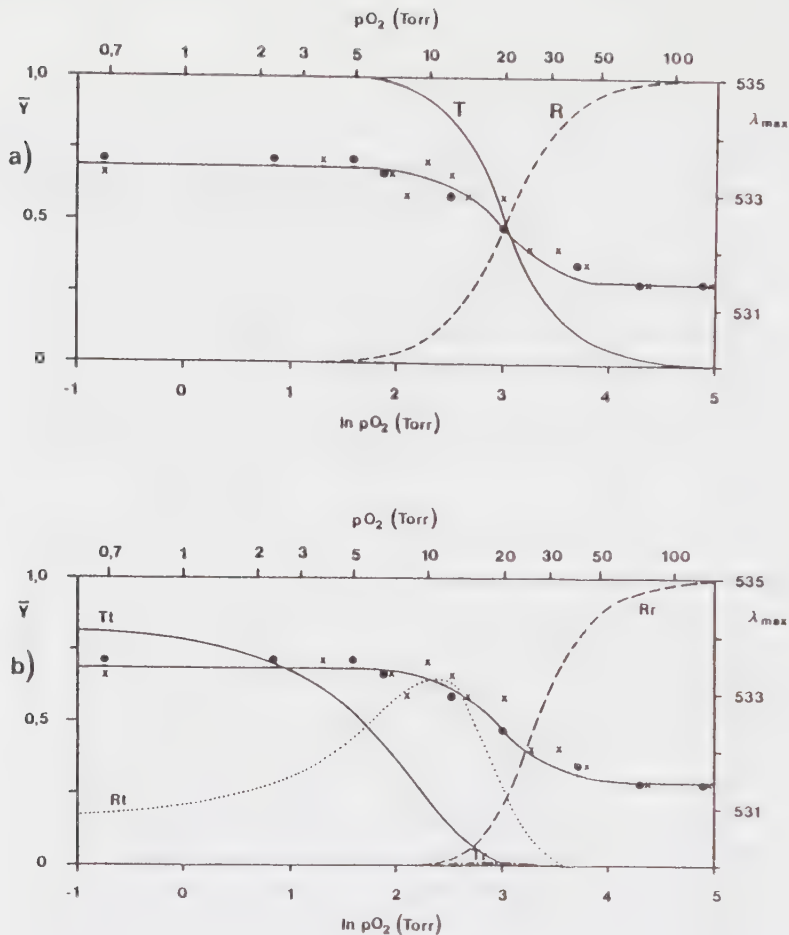


Abb. 50: a) Verlauf der Speziesverteilung (R - - -; T —; MWC-Modell $N=12$) und des Fluoreszenzmaximums ($\bullet$, $\times$; entspricht zwei verschiedenen Messungen) für Hämocyanin + NBD-chlorid, pH 7,00, in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. $K_R = 0,098$; $K_T = 0,031$; $L = 1,57 \times 10^3$. b) Verlauf der Speziesverteilung (R_r - - -; R_t ...; T_r - · - ·; T_t —; Nesting 2×12) und des Fluoreszenzmaximums ($\bullet$, $\times$) für Hämocyanin + NBD-chlorid, pH 7,00, in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. $K_{Rr} = 0,11$; $K_{Rt} = 0,037$; $L_R = 5060$; $K_{Tr} = 1,056$; $K_{Tt} = 0,003$; $L_T = 2,19 \times 10^{13}$; $L = 3$.

gute Übereinstimmung zwischen Speziesverteilung und Fluoreszenz-emissionsmaximumsverlauf zu beobachten (Abb. 50a), da die Übergangspunkte beim gleichen Sauerstoffpartialdruck zu finden sind. Unterhalb von $pO_2 = 20$ Torr liegt eine Spezies vor (Maximum 533,5 nm) und oberhalb von $pO_2 = 20$ Torr eine zweite (Maximum 531,5 nm). Beim Vergleich der gefitteten Parameter in Tabelle 7 zeigt es sich, daß K_R ($N=12$) dem Wert von K_{Rr} (Nesting 2x12) und K_T ($N=12$) dem Wert von K_{Rt} (Nesting 2x12) entspricht. Man kann also der Konformation Rt die Wellenlänge 533,5 nm zuordnen (Abb. 50b).

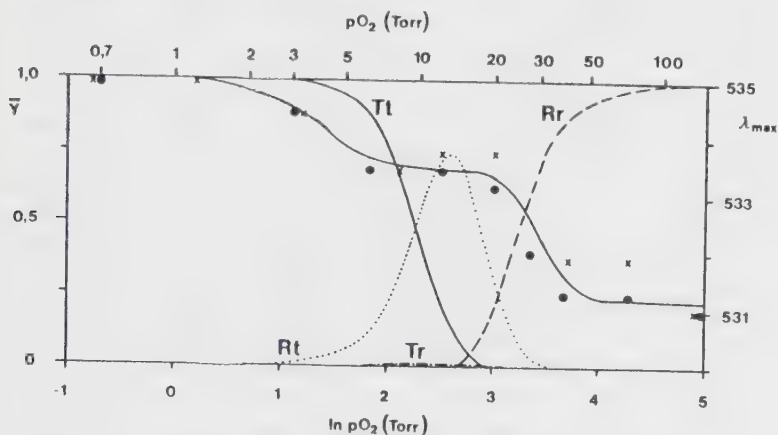


Abb. 51: Verlauf der Speziesverteilung (Rr - - -; Rt ...; Tr - · - ·; Tt —; Nesting 2x12) und des Fluoreszenzmaximums (●, x; entspricht zwei verschiedenen Messungen) für Hämocyanin + NBD-chlorid, pH 7,80, in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. $K_{Rr} = 2,264$; $K_{Rt} = 0,032$; $L_R = 5,44 \times 10^{17}$; $K_{Tr} = 1,235$; $K_{Tt} = 0,0135$; $L_T = 5,30 \times 10^{14}$; $L = 119$.

Auch für pH 7,80 lassen sich bestimmte Konformationen nach dem Nesting-Modell (2x12) in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck nachweisen (Abb. 51).

Im Bereich von 8 bis 20 Torr ist die maximale Emissionswellenlänge 533,5 nm konstant. Er würde nach dem für pH 7,00 festgestellten Verlauf dem Konformationszustand Rt entsprechen. Interessanterweise wird in diesem Bereich nach dem Nesting-Modell (2x12) für die Population Rt ein Maximum vorhergesagt. Bei größerem Sauerstoffpartialdruck zeigt sich eine maximale Emissionswellenlänge von 531 nm, möglicherweise entspricht diese Wellenlänge einer Überlagerung der Signale, die vom Tr-Zustand (531,5 nm) und vom

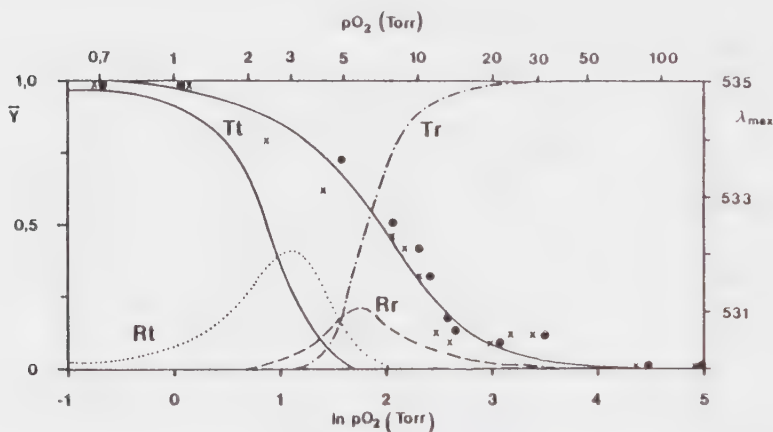


Abb. 52: Verlauf der Speziesverteilung (Rr - - -; Rt ...; Tr - . - .; Tt —; Nesting 2x12) und des Fluoreszenzmaximums (●; x; entspricht zwei verschiedenen Messungen) von Hämocyanin + NBD-chlorid, pH 8,50, in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. $K_{Rr} = 0,364$; $K_{Rt} = 0,109$; $L_R = 465$; $K_{Tr} = 1,412$; $K_{Tt} = 0,060$; $L_{Tr} = 4,74 \times 10^6$; $L = 6,7$.

Rr-Zustand (530 nm) herrühren. Legt man die Vorhersage der Populationen der vier Konformationszustände an nicht fluoreszenzmarkiertem Hämocyanin nach DECKER et al. (1986) zugrunde, könnten diese Überlegungen noch zusätzlich gestützt werden. Abweichun-

gen von Populationsvorhersage und Wellenlängenmaximumsverlauf bei meinen Versuchen ist möglicherweise auf den Einfluß des gebundenen fluoreszierenden Stoffes bzw. auf die Präparation des Hämocyanins zurückzuführen.

Bei pH 8,50 findet man zwei ausgeprägte Fluoreszenzemissionsmaxima, bei 535 nm im desoxygenierten und 530 nm im oxigenierten Zustand. Eine Berechnung der Speziesverteilung ergab, daß im sauerstofffreien Zustand der Tt-Zustand vorliegt (genau wie bei pH 7,80), dem das Emissionsmaximum bei 535 nm zugeordnet werden kann. Im oxigenierten Zustand tritt dagegen fast ausschließlich der Tr-Zustand auf, der sich nur bei pH 8,50 nachweisen läßt (Abb. 52).

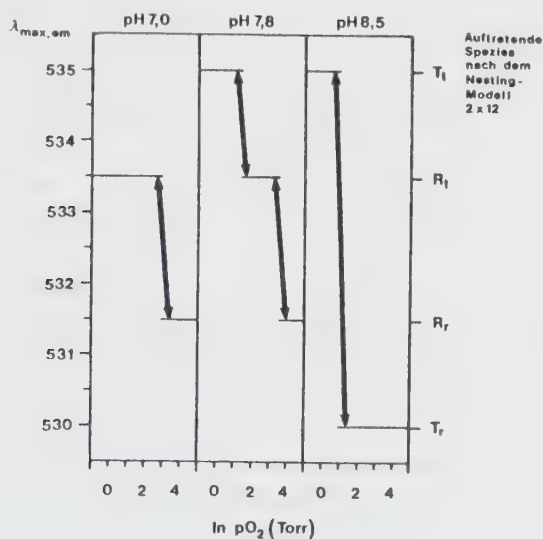


Abb. 53: Mögliche Konformationsübergänge des Hämocyanins in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck, wie sie nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit stattfinden könnten.

Zusammenfassend lassen sich die Zuordnungen von Emissionsmaxima und Übergängen von den Konformationszuständen ineinander bei ver-

schiedenen pH-Werten in Abbildung 53 darstellen. Durch diese Versuche konnte zum einen gezeigt werden, daß Konformationszustände angezeigt und andererseits auch ihre Übergänge verfolgt werden können. Die gewonnenen Daten schließen die Anwendbarkeit des einfachen, ursprünglichen MWC-Modells aus und bestätigen das Vorkommen von mehreren Konformationen, wie sie dem Nesting-Modell entsprechen.

Stufenweise Änderungen der Konformation bei Ligandenbindung sind auch schon bei einer Reihe anderer Proteine nachgewiesen worden. BURGER et al. (1984) konnten eine sequenzielle Konformationsänderung am Calmodulin bei Calciumbindung nachweisen. Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie (als fluoreszierende Sonde verwendeten Sie das nicht kovalent bindende TNS) und CD-Spektren gelang es ihnen nachzuweisen, daß vier verschiedene Konformationen des Proteins existieren. Calmodulin besitzt vier Bindungsstellen für Calcium mit vier verschiedenen Bindungskonstanten für das Metall. Die stärkste Änderung der Konformation tritt bei der Bindung des dritten Ca^{2+} -Atoms auf, während die Bindung des ersten, zweiten und vierten Calciumions nur kleinere Konformationsänderungen zur Folge hat.

REED und KINZEL (1984) sowie REED et al. (1985) konnten mit Hilfe der CD-Spektroskopie drei verschiedene Konformationen der ATP-Bindungsstelle der Proteinkinase nachweisen. Abhängig von der Art des Substrates ließen sich neben der Konformation im unligandierten Zustand noch zwei weitere Konformationen aufzeigen. Die eine tritt auf, wenn eine phosphorylierbare Hydroxylgruppe am Substrat vorhanden ist, und die andere wenn an einer Nebenbindungsstelle ("basic subsite") ein Argininrest des Enzyms mit einem Serin- oder Threoninrest des Substrats in Wechselwirkung treten kann.

Schließlich konnten SCHMIDT et al. (1982) mit Hilfe von NMR-Spektren mehrere verschiedene Konformationen des Pepsins bei Bindung verschiedener Inhibitoren aufzeigen. Pepstatin (Peptid) und synthetisch hergestellte Derivate davon verursachten bei einer Bindung an das Pepsin jedesmal den Übergang aus der Konformation, die vorherrscht wenn kein Inhibitor gebunden ist, in eine andere Kon-

formation.

Die vorliegende Arbeit hat sich eingehend mit Konformationsänderungen am 24-meren Hämocyanin der Vogelspinne *Eurypelma californicum* auseinandergesetzt. Interessante Untersuchungen könnte man in Zukunft auch an isolierten Dissoziationszwischenstufen (19-mer, 12-mer, Heptamer und Hexamer) durchführen. Treten bei diesen Zwischenstufen die gleichen oder andere Wellenlängenverschiebungen auf und wie wären diese Verschiebungen im Hinblick auf die allosterischen Wechselwirkungen zu beurteilen? Eine weitere Möglichkeit bestünde darin, ähnliche Untersuchungen am Hämocyanin anderer Arthropoden (z.B. *Cupiennius salei*, *Astacus leptodactylus*, *Carcinus maenas*) durchzuführen. Diese Spezies haben ein nur aus 12-meren bzw. Hexameren aufgebautes Hämocyanin und von da her gesehen eingeschränktere Möglichkeiten der allosterischen Wechselwirkung. Ein völlig neues und daher sicherlich ebenfalls hochinteressantes Gebiet wären Untersuchungen zur Konformationsänderung am Hämocyanin mit Hilfe des Fluoreszenzenenergietransfers, wie sie z.B. bei STRYER (1968, 1978) beschrieben sind. Da eine ganze Anzahl von Fluoreszenzfarbstoffen relativ leicht am Hämocyanin zu binden ist, ließen sich sicherlich zwei geeignete fluoreszierende Stoffe finden, die an spezifischen Positionen im Molekül gebunden werden können. Der eine müßte dabei als Donor, der andere als Akzeptor dienen, wobei das Emissionsspektrum des Donors das Anregungsspektrum des Akzeptors überlagern müßte. Aus solchen Messungen kann man einerseits den exakten Abstand zwischen Donor und Akzeptor bestimmen und andererseits über die Änderungen dieser Abstände bei Konformationsänderungen Aussagen machen. Die überbrückbaren Distanzen liegen bei einem geeigneten Donor/Akzeptorpaar bei etwa 5 nm.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde versucht, insgesamt 23 fluoreszierende Stoffe an das Hämocyanin von *Eurypelma californicum* zu binden (3 nicht kovalent bindende, 20 kovalent bindende, davon 12 aminspezifische und 8 sulfhydrylspezifische). Bis auf bis-ANS (nicht kovalent) und Ethoxy (aminspezifisch) konnten alle Sonden problemlos an das Hämocyanin gebunden werden. 2 Stunden Reaktionsdauer bei 25⁰C im Wasserbad reichten in allen Fällen aus. Nichtgebundener Farbstoff im Falle der kovalent bindenden Chromophore konnte quantitativ über eine Sephadex G 25 s.f.-Säule abgetrennt werden.

2. Die Auswirkung der Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen auf die Kooperativität des Hämocyanins wurde untersucht. Am wenigsten beeinträchtigt die Bindung von ANS die Kooperativität (-6%, bezogen auf nicht markiertes Hämocyanin = 100%), am stärksten wird das Hämocyanin durch die Bindung von NBD-aziridin (-19%) beeinflusst. Das für die funktionellen Untersuchungen verwendete NBD-chlorid-markierte Hämocyanin zeigte zwischen 8 und 10% Abfall in der Kooperativität. Alle Kooperativitätsmessungen wurden ohne Zusatz von Ca²⁺ und Mg²⁺ in 0,1 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,80, durchgeführt.

3. Die Fluoreszenzemissionsspektren von markiertem Hämocyanin wurden in oxigeniertem und desoxigeniertem Zustand untersucht. Dabei wurde in allen Fällen außer einem (NBD-chlorid) nur eine Änderung der Fluoreszenzintensität, aber keine Änderung der maximalen Emissionswellenlänge in Abhängigkeit vom Oxigenierungszustand gefunden.

4. NBD-chlorid-markiertes Hämocyanin zeigt bei pH 7,80 im oxigenierten Zustand ein Maximum von 531,2 nm ($\pm$ 0,2 nm), im desoxigenierten Zustand von 535,2 nm ($\pm$ 0,2 nm). Bei intermediären Sauerstoffpartialdrücken läßt sich noch ein zusätzlicher Zustand zwi-

schen etwa 10 und 20 Torr mit einem Maximum von 533,5 nm nachweisen. Bei pH 7,00 findet man zwei Zustände, die durch Emissionsmaxima bei 533,5 nm (desoxi) und 531,5 nm (oxi) bestimmt sind; bei pH 8,50 treten ebenfalls zwei Zustände auf mit Maxima bei 535 nm (desoxi) und 530 nm (oxi).

5. Die Bindungsrate des NBD-chlorids am Hämocyanin wurde bestimmt. Man findet eine Abhängigkeit der Bindungsrate von der Menge des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs. Bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen ist eine selektive Markierung der Untereinheit d möglich.

6. Der Bindungsort des gebundenen NBD-chlorids an an der selektiv markierten Untereinheit d wurde bestimmt. Die Untereinheit wurde mehrfach enzymatisch gespalten, die Spaltgemische aufgetrennt und nach fluoreszierenden Peptiden untersucht. Das über HPLC gereinigte fluoreszierende Peptid aus der *Staphylococcus aureus* V8-Protease-Spaltung wurde anschließend von Hand sequenziert. Der markierte Rest war ein Lysin in Position 522 (nach der Numerierung von LINZEN et al., 1985).

7. Durch den Vergleich der vorliegenden Tertiärstrukturdaten mit einem verwandten Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* und durch Strukturvorhersagen nach Chou-Fasman und Robson-Garnier sieht man, daß der Bindungsort an der Oberfläche des Moleküls liegt. Dies ist mit den beobachteten Wellenlängenänderungen, die auf ein Vorliegen des fluoreszierenden Restes einmal in hydrophober Umgebung (kurzes Emissionsmaximum) und einmal in hydrophiler Umgebung (langes Emissionsmaximum) hindeuten, gut vereinbar.

8. Die Sauerstoffbindungskurven des markierten Hämocyanins wurden nach den verschiedenen Modellen über kooperative Wechselwirkungen gefittet. Nach dem Nesting-Modell(2x12), für das bei pH 7,80 und 8,50 die besten Konstanten ermittelt werden konnten, wurde die Verteilung der dort auftretenden Spezies ermittelt und mit den

beobachteten Wellenlängenverschiebungen verglichen. Für pH 7,00 ergaben sich nach dem MWC-Modell ($N=12$) die besten Fits. Eine mögliche Zuordnung von berechneten und gefundenen Zuständen wird gegeben.

LITERATURVERZEICHNIS

- ACKERS, G.K., JOHNSON, M.L., MILLS, F.C. und IP, S.H.C. (1976). Oxygenation-Linked Subunit Interaction in Human Hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69, 135-142.
- ARAV, R., ADEREM, A.A. und BERMAN, M.C. (1983). Interaction of Nucleotides and Cations with the (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase of Sarcoplasmic Reticulum as Determined by Fluorescence Changes of Bound 1-Anilino-8-naphthalenesulfonate. *J. Biol. Chem.* 258, 10433-10438.
- ARTYMIUK, P.J., BLAKE, C.C.F., GRACE, D.E.P., OSTLEY, S.J., PHILLIPS, D.C. und STERNBERG, M.J.E. (1979). Protein mobility: Cristallographic studies of the dynamic properties of lysozyme. *Nature* 280, 563-568.
- BANNISTER, J.V., ed. (1977). *Structure and Function of Haemocyanin*. Springer Verlag, Berlin.
- BLEWITT, M.G., ZHAO, J.M., McKEEVER, B., SARMA, R. und LONDON, E. (1984). Fluorescence Characterisation of the low-pH Induced Change in Diphtheria Toxin Conformation: Effect of Salt. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 120, 286-290.
- BRAND, L. und GOHLKE, J.R. (1972). Fluorescence Probes for Structure. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 843-868.
- BREWER, J.M., PESCE, A.J. und ASHWORTH, R.B. (1977). *Experimentelle Methoden in der Biochemie*. G.Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- BURGER, D., COX, J.A., COMTE, M. und STEIN, E.A. (1984). Sequential Conformational Changes in Calmodulin upon Binding of Calcium. *Biochemistry* 23, 1966-1971.

BROGLIE, K.E. und TAKAHASHI, M. (1983). Fluorescence Studies of Threonine-promoted Conformational Transitions in Aspartokinase I Using the Substrate Analogue 2'(3')-O-(2,3,6-Trinitrophenyl)adenosine 5'-Triphosphate. *J. Biol. Chem.* 258, 12940-12946.

CANTOR, C.R. und TIMASHEFF, S.N. (1982). In: *The Proteins V* (H. Neurath und R.L. Hill, eds.). Academic Press, New York.

CHANG, J.Y., BRAUER, D. und WITTMANN-LIEBOLD, B. (1978). Micro-sequence analysis of peptides and proteins using 4-N,N-dimethylaminobenzene-4'-isothiocyanate/phenylisothiocyanate double coupling method. *FEBS Letters* 93, 205-214.

CHOU, P.Y. und FASMAN, G.D. (1978). Prediction of Secondary Structure of Proteins from their Amino Acid Sequence. *Adv. Enzymol.* 47, 45-148.

CHU, A.H., TURNER, B.W. und ACKERS, G.K. (1984). Effects of Protons on the Oxygenation-Linked Subunit Assembly in Human Hemoglobin. *Biochemistry* 23, 604-617.

CRESTFIELD, A.M., MOORE, S. und STEIN, W.H. (1963). The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.* 238, 622-627.

DECKER, H., SCHMID, R., MARKL, J. und LINZEN, B. (1980). Hemocyanin in Spiders XII. Dissociation and Reassociation of Eurypelma Hemocyanin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1707-1717.

DECKER, H. (1981). Zur Quartärstruktur und Sauerstoffbindung beim Hämocyanin aus der Vogelspinne Eurypelma californicum. Dissertation, Universität München.

DECKER, H., ROBERT, C.H. und GILL, S.J. (1986). Nesting - An Extension of the Allosteric Model and its Application to Tarantula Hemocyanin. In: Invertebrate Oxygen Carriers (B. Linzen, ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo; 383-388.

DECKER, H., CONNELLY, P.R., ROBERT, C.H. und GILL, S.J. (1987). Oxygen and Carbon Monoxide Binding to Tarantula Hemocyanin. Biochemistry, in Vorbereitung.

ECKERSKORN, E. (1986). Zur Wechselwirkung der Untereinheiten beim Vogelspinnen-Hämocyanin. Der Effekt der Oxidation einzelner aktiver Zentren. Diplomarbeit, Universität München.

ELLERTON, H.D., ELLERTON, N.F. und ROBINSON, H.A. (1983). Hemocyanin - a current perspective. Progr. Biophys. Mol. Biol. 41, 143-258.

EMINI, E.A., HUGHES, J.V., PERLOW, D.S. und BAGER, I. (1985). Induction of Hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J. Virol. 55, 836-839.

FELSENFELD, G. und PRINTZ, M. (1959). Specific Reactions of Hydrogen Peroxide with the Active Site of Hemocyanin. The Formation of Methemocyanin. J. Am. Chem. Soc. 81, 6259-6264.

FRAUENFELDER, H., PETSKO, G.A. und TSERNOGLON, D. (1979). Temperature dependent X-ray diffraction as a probe of protein structure dynamics. Nature 280, 558-563.

FRIEDEN, C., LIEBERMAN, D. und GILBERT, H.R. (1980). A Fluorescent Probe for Conformational Changes in Skeletal Muscle G-Actin. J. Biol. Chem. 255, 8991-8993.

GARNIER, J., OSGUTHORPE, O.J. und ROBSON, B. (1985). Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120, 97-120.

GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. und BEINTEMA, J.J. (1984). 3,2 Å structure of the coppercontaining, oxygen-carrying protein Panulirus interruptus haemocyanin. *Nature* 309, 23-29.

GHIRETTI, F., ed. (1968). Physiology and biochemistry of hemocyanins. Academic Press, London und New York.

GIELENS, C., VERSCHUEREN, L.J., PREAUX, G. und LONTIE, R. (1980). Fragmentation of crystalline β-hemocyanin of *Helix pomatia* with plasmin and trypsin. Location of the fragments in the polypeptide chain. *Eur. J. Biochem.* 103, 463-470.

HAUGLAND, R.P. (1983). Covalent Fluorescent Probes. In: Excited States of Biopolymers (Steiner, R.F., ed.). Plenum Press, London und New York, S.29-58.

HEWITT, J.A., KILMARTIN, J.V., TEN EYCK, L.F. und PERUTZ, M.F. (1972). Noncooperativity of the αβ Dimer in the Reaction of Hemoglobin with Oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 69, 203-207.

HIRATSUKA, T. und UCHIDA, K. (1980). Lysyl Residues of Cardiac Myosin Accessible to Labeling with a Fluorescent Reagent, N-Methyl-2-Anilino-6-Naphthalenesulfonyl Chloride. *J. Biochem.* 88, 1437-1448.

HIRATSUKA, T. (1981). Actin-Induced Conformational Changes around the Reactive Fluorescence-Labeled Lysyl Residues Located in the Subfragment 1/Subfragment 2 Link Region of Cardiac Myosin. *J. Biol. Chem.* 256, 10645-10650.

HIRATSUKA, T. (1983). Fluorescence Studies on Actin Induced Conformational Changes around Subfragment 1/Subfragment 2 Link Region of Cardiac Myosin. In: Actin: Structure and Function in Muscles and Non-Muscle-Cells (Remedios, C.G.D. und Barden, J.A., eds.). Academic Press (Sydney), 285-292.

HUBER, R. und BENNETT, W.S., Jr. (1982). Enzyme als Biokatalysatoren. In: Biophysik (W. Hoppe, W. Lehmann, H. Markl, H. Ziegler, eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

JULLIEN, M. und GAREL, J.R. (1981). Fluorescent Probe of Ribonuclease A Conformation. *Biochemistry* 20, 7021-7026.

JOHNSON, M.L., TURNER, B.W. und ACKERS, G.K. (1984). A quantitative model for the cooperative mechanism of human hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81, 1093-1097.

KANAOKA, Y. (1977). Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen. *Angew. Chem.* 89, 142-152.

KELLA, N.K.D., ROBERTS, D.D., SHAFER, J.A. und GOLDSTEIN, I.J. (1984). Fluorescence Energy Transfer Studies on Lima Bean Lectin. *J. Biol. Chem.* 259, 4777-4781.

KEMPTER, B. (1983). Die Anwendung spezifischer Antikörper zur Untersuchung eines Spinnenhämocyanins: Quartärstruktur, Verwandtschaftsbeziehungen, Biosyntheseort. Dissertation, Universität München.

KOSHLAND, D.E., Jr., NEMETHY, G. und FILMER, D. (1966). Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry* 5, 365-385.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227, 680-685.

LAKOWICZ, J.R. und WEBER, G. (1973a). Quenching of protein fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* 12, 4161-4170.

LAKOWICZ, J.R. und WEBER, G. (1973b). Quenching of fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale. *Biochemistry* 12, 4171-4179.

LAMY, J. und LAMY J., eds. (1981). *Invertebrate Oxygen Binding Proteins: Structure, Active Site, and Function*. Marcel Dekker, New York.

LEE, J.A. und FORTES, P.A.G. (1985). Labeling of the Glycoprotein Subunit of (Na,K)ATPase with Fluorescent Probes. *Biochemistry* 24, 322-330.

LEHNINGER, A.L. (1977). *Biochemie*. Verlag Chemie, Weinheim.

LEHRER, S.S. und LEAVIS, P.C. (1974). Fluorescence and Conformational Changes caused by Proton Binding to Troponin C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 58, 159-165.

LINZEN, B. (1983). Subunit Heterogeneity in Arthropodan Hemocyanins. In: *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins* (Wood, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Supplement 1, Harwood Academic Press, Chur, London, New York.

LINZEN, B., SOETER, N.M., RIGGS, A.F., SCHNEIDER, H.-J., SCHARTAU, W., MOORE, M.D., YOKOTA, E., BEHRENS, P.Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T., NEMOTO, T., VEREIJKEN, J.M., BAK, H.J., BEINTEMA, J.J., VOLBEDA, A., GAYKEMA, W.D.J. und HOL, W.G.J. (1985). The Structure of Arthropod Hemocyanins. *Science* 229, 519-524.

LINZEN, B., ed. (1986). *Invertebrate Oxygen Carriers*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

LOEWE, R. und LINZEN, B. (1973). Hemocyanins in spiders I. Subunit and stability region of *Dugesia californica* hemocyanin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 182-188.

LOEWE, R. und LINZEN, B. (1975). Hemocyanins in spiders II. Automatic Recording of oxygen binding curves, and the effect of Mg^{++} on oxygen affinity, cooperativity, and subunit association of *Cupiennius salei* haemocyanin. *J. Comp. Physiol.* 98, 147-156.

LOEWE, R. (1978). Hemocyanins in spiders V. Fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. *J. Comp. Physiol.* 128, 161-168.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, H.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

MARKL, J., SCHMID, R., CZICHOS-TIEDT, S., und LINZEN, B. (1976). Hemocyanins in spiders III. Chemical and Physical Properties of the Proteins in *Dugesia* and *Cupiennius* Blood. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1713-1725.

MARKL, J., SAVEL, A., DECKER, H. und LINZEN, B. (1980). Hemocyanins in spiders IX. Homogeneity, subunit composition and the basic oligomeric structure of *Eurypelma californicum* hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 649-660.

MARKL, J., KEMPTER, B., LINZEN, B., BIJLHOLT, M.M.C. und VAN BRUGGEN, E.F.J. (1981). Hemocyanin in Spiders XVI. Subunit Topography and a Model of the Quarternary Structure of *Eurypelma* Hemocyanin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1631-1641.

MARKL, J., DECKER, H., LINZEN, B., SCHUTTER, W. und VAN BRUGGEN, E.F.J. (1982). Hemocyanin in Spiders XV. The Role of Individual Subunits in the Assembly of *Eurypelma* Hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 73-87.

MARQUARDT, D.W. (1963). An Algorithm for Least Squares Estimation of Nonlinear Parameters. J. Soc. Indust. Appl. Math. 11, 131-142.

MATSUMOTO, S. und HAMMES, G.G. (1975). Fluorescence Energy Transfer between Ligand Binding Sites on Aspartat Transcarbamylase. Biochemistry 14, 214-223.

MAURER, H.R. (1968). Disc-Elektrophorese. Walter de Gruyter & Co., Berlin.

MILLS, F.C., JOHNSON, M.L. und ACKERS, G.K. (1976). Oxygenation-Linked Subunit Interactions in Human Hemoglobin: Experimental Studies on the Concentration Dependence of Oxygenation Curves. Biochemistry 15, 5350-5362.

MONOD, J., WYMAN, J. und CHANGEUX, J.P. (1965). On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Modell. J. Mol. Biol. 12, 88-118.

MUSCI, G. und BERLINER, L.J. (1985). Probing Different Conformational States of Bovine α -Lactalbumin: Fluorescence Studies with 4,4'-Bis(1-phenylamino)-8-naphthalenesulfonate. *Biochemistry* 24, 3852-3856.

MUNRO, I., PECHT, I. und STRYER, L. (1979). Subnanosecond motions of tryptophan residues in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76, 56-60.

OLWIN, B.B. und STORM, D.R. (1983). Preparation of Fluorescent Labeled Calmodulins. *Meth. Enzymol.* 102, 148-157.

PAULING, L. und COREY, R.B. (1951a). The structure of proteins: Two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 37, 205-211.

PAULING, L. und COREY, R.B. (1951b). Atomic coordinates and structural factors for two helical configurations of polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 37, 235-240.

PAULING, L. und COREY, R.B. (1951c). Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: Two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 37, 729-740.

PERUTZ, M.F. (1970). Stereochemistry of Cooperative Effects in Haemoglobin. *Nature (London)* 228, 726-734.

PERUTZ, M.F. (1978). Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Sci. Am.* 239, 68-86.

REED, J. und KINZEL, V. (1984). Ligand Binding Site Interaction in Adenosine Cyclic 3'5'-Monophosphate Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit: Circular Dichroic Evidence for Intramolecular Transmission of Conformational Change. *Biochemistry* 23, 968-978.

REED, J., KINZEL, V., KEMP, B.E., CHENG, H.-C. und WALSH, D.A. (1985). Circular Dichroic Evidence for an Ordered Sequence of Ligand/Binding Site Interactions in the Catalytic Reaction of the cAMP-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 24, 2967-2973.

REISINGER, P. (1985). Zur Primär- und Sekundärstruktur des Hämocyanins der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, Universität München.

RICCHELLI, F. und SALVATO, B. (1979). The Binding of 1-Anilino-8-naphthalene Sulfonate to the Hemocyanin of *Octopus vulgaris*. *Eur. J. Biochem.* 94, 199-205.

RICHEY, B., DECKER, H. und GILL, S.J. (1985). Binding of Oxygen and Carbon Monoxide to Arthropod Hemocyanin: An Allosteric Analysis. *Biochemistry* 24, 109-117.

ROBERT, C.H., DECKER, H., RICHEY, B., GILL, S.J. und WYMAN, J. (1987). Nesting: Hierarchies of allosteric interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84, 1891-1895.

SAVEL, A. (1979). Zur Frage der Einheitlichkeit des 37S Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Zulassungsarbeit, Universität München.

SAVEL, A. (1984). Quartärstruktur und Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des 37S Hämocyanins aus der Vogelspinne *Eurypelma californicum*. Dissertation, Universität München.

SCHMIDT, P.G., BERNATOWICZ, M.S. und RICH, D.H. (1982). Pepstatin Binding to Pepsin. Enzyme Conformation Changes Monitored by Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry* 21, 6710-6716.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (1979). Animal Physiology: Adaptation and Environment. Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, Melbourne.

SCHNEIDER, H.J., MARKL, J., SCHARTAU, W. und LINZEN, B. (1977). Hemocyanins in spiders IV. Subunit heterogeneity of Eurypelma (Dugesia) hemocyanin and separation of polypeptide chains. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1133- 1141.

SCHULZ, G.E. und SCHIRMER, R.H. (1979). Principles of Protein Structure. Springer Advanced Texts in Chemistry (Cantor, C.R., ed.). Springer Verlag New York, Heidelberg, Berlin.

STEINHÄUSER, K.G., WOOLEY, P., DIJK, J. und EPE, B. (1983). Distance measurements by energy transfer. Eur. J. Biochem. 137, 337-345.

STRICKLAND, D.K., STEINER, J.P., FELDMAN, S.R. und PIZZO, S.V. (1984). Fluorescent Probes as a Measure of Conformational Alterations Induced by Nucleophilic Modification and Proteolysis of Bovine α_2 -Macroglobulin. Biochemistry 23, 6679-6685.

STRYER, L. (1968). Fluorescence Spectroscopy of Proteins. Science 162, 526-533.

STRYER, L. (1978). Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. Ann. Rev. Biochem. 47, 819-846.

TAYLOR, D.G. und DEMAS, J.N. (1979). Light Intensity Measurement I: Large Area Bolometers with Microwatt Sensitivities and Absolute Calibration of the Rhodamin B Quantum Counter. Anal. Chem. 51, 712-717.

VAN BRUGGEN, E.F.J. (1983). An electron microscopist's view of the quarternary structure of arthropodan and molluscan hemocyanin. In: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins (Wood, E.J., ed.). Life Chemistry Reports, Supplement 1, Harwood Academic Publishers, Chur, London, New York, 1-14.

VAN HOLDE, K.E. und MILLER, K.J. (1982). Hemocyanins. Quart. Rev. Biophys. 15, 1-129.

WADSWORTH, P. und SLOBODA, R.D. (1984). Modification of Tubulin with the Fluorochrome 5-(4,6-Dichlorotriazin-2-yl)-aminofluorescein and the Interaction of the Fluorescent Protein with the Isolated Meiotic Apparatus. Biol. Bull. 166, 357-367.

WEBER, K. und OSBORN, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

WEEKE, B. (1973). Crossed Immunelectrophoresis. Scand. J. Imm. 2, 47-59.

WÜTHRICH, K. und WAGNER, K. (1978). Internal Motion in Globular Proteins. Trends Biochem. Sci. 3, 227-228.

WOOD, E.J. (1983). Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982. Life Chemistry Reports, Supplement 1, Harwood Academic Publishers, Chur, London, New York.

WYMAN, J. (1972). On Allosteric Models. Curr. Top. Cell. Reg. 6, 209-226.

WYMAN, J. (1984). Linkage graphs: A study in thermodynamics of macromolecules. Quart. Rev. Biophys. 17, 453-488.

YASUOKA-YABE, K. und KAWAKITA, M. (1983). Studies on Conformational Transitions of Ca^{2+} , Mg^{2+} -Adenosine Triphosphatase of Sarco-plasmatic Reticulum. I. Selective Labeling of Functionally Distinct Sulfhydryl Groups with Conformational Probes and Evidence for a Ca^{2+} -Dependent Conformational Change. J. Biochem. 94, 665-675.

LEBENS LAUF

1. Persönliche Daten:

Name:	Leidescher, Thomas
Geburtsdatum:	23. März 1955
Geburtsort:	Memmingen
Eltern:	Rudolf Leidescher, ehem. Beamter, und Ursula Leidescher, geb. Klein, Hausfrau

2. Schulbildung:

1961 - 1966	Bismarckschule Memmingen (Volksschule)
1966 - 1975	Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
21.06. 1975	Reifeprüfung

3. Wehrdienst:

01.07. 1975	-	Grundwehrdienst bei der Luftwaffe der Bundeswehr
30.09. 1976		

4. Studium:

1976	Beginn des Biologiestudiums (Diplom) an der Universität München
1978	Vordiplom in Biologie (Allgemeine Biologie, Zoologie, Chemie, Physik)
1983	Hauptdiplom in Biologie (Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Genetik, Biochemie) Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München bei Prof. Dr. B. Linzen
01.08. 1983	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Zoologischen Institut der Universität München

